

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004274

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-096685
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

04.03.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 2 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 9 6 6 8 5
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

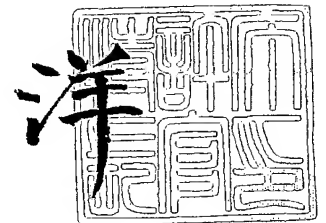
J P 2 0 0 4 - 0 9 6 6 8 5

出 願 人 国立大学法人京都大学
Applicant(s):

2 0 0 5 年 4 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 A6261
【提出日】 平成16年 3月29日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
A61K 39/395

【発明者】
【住所又は居所】 京都市北区紫竹栗栖町 2 3 - 2
【氏名】 中邨 智之

【特許出願人】
【識別番号】 503310763
【氏名又は名称】 社団法人芝蘭会

【代理人】
【識別番号】 100080791
【弁理士】
【氏名又は名称】 高島 一
【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 006965
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断により得られうるポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 4】

配列番号 5 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断により得られうるポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 5 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 8】

配列番号 7 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 9】

DANCE を DANCE 特異的プロテアーゼに接触させることを特徴とする、DANCE の切断方法。

【請求項 10】

請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドに特異的親和性を有する抗体。

【請求項 11】

請求項 5 又は 6 記載のポリペプチドに特異的親和性を有するモノクローナル抗体。

【請求項 12】

動物由来の生体試料において DANCE の切断量を測定することを特徴とする方法。

【請求項 13】

抗 DANCE 抗体を含有することを特徴とする、DANCE の切断量の測定用キット。

【請求項 14】

DANCE 特異的プロテアーゼによる DANCE の切断部位に、当該プロテアーゼに抵抗性を示すようにアミノ酸変異が導入されている、DANCE 変異体。

【請求項 15】

請求項 14 記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 16】

少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体。

【請求項 17】

識別可能な形態である少なくとも 2 種類の DANCE を含んでなる、請求項 16 記載の複合体。

【請求項 18】

リシルオキシダーゼ及び／又は LTBP2 をさらに含んでなる請求項 16 又は 17 記載の複合体。

【請求項 19】

少なくとも 1 つの DANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又は LTBP2 を含んでなる DANCE 複合体。

【請求項 20】

少なくとも 2 つの DANCE を接触させ、複合体を形成させることを特徴とする、少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体の調製方法。

【請求項 21】

少なくとも1つのDANCEをリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2に接触させ、複合体を形成させることを特徴とする、少なくとも1つのDANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2を含んでなるDANCE複合体の調製方法。

【請求項22】

以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法:

(a) 被検物質を、DANCE特異的プロテアーゼに接触させる工程:

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を接触させない場合のDANCE特異的プロテアーゼの活性と比較する工程;

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

【請求項23】

弾性線維形成調節剤を同定するための方法である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法:

(a) 被検物質を動物に投与する工程:

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を投与しない場合のDANCE特異的プロテアーゼの活性と比較する工程;

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

【請求項25】

以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法:

(a) 被検物質の存在下、少なくとも2つのDANCEを接触させる工程:

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程;

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

【請求項26】

識別可能な形態である少なくとも2種類のDANCEを用いる、請求項25記載の方法。

【請求項27】

以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、少なくとも1つのDANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2を含んでなるDANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法:

(a) 被検物質の存在下、少なくとも1つのDANCEをリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2に接触させる工程:

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程;

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

【請求項28】

請求項23～27のいずれか1項記載の方法により得られうる弾性線維形成調節剤。

【請求項29】

DANCEの切断活性を指標とする、DANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法。

【請求項30】

請求項 29 記載の方法により得られうる DANCE 特異的プロテアーゼ。

【請求項 31】

請求項 29 記載の方法により得られうる DANCE 特異的プロテアーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項 32】

請求項 30 記載の DANCE 特異的プロテアーゼ、又は請求項 31 記載のポリヌクレオチドを含有する弾性線維形成調節剤。

【請求項 33】

以下 (a) 及び (b) を含むキット：

(a) DANCE、又は DANCE をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 以下 (i) ～ (v i) の少なくとも 1 つの成分：

(i) (a) の DANCE と識別可能な形態の DANCE ；

(i i) (a) の DANCE と識別可能な形態の DANCE をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(i i i) リシルオキシダーゼ；

(i v) リシルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(v) LTBP 2 ；

(v i) LTBP 2 をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【書類名】明細書

【発明の名称】切断型DANCE、DANCE複合体、及びこれらを用いる方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、DANCEの切断により得られるポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド；DANCEの切断方法；DANCEの切断により得られるポリヌクレオチドに対する抗体；DANCE切断量の測定方法・キット；DANCE変異体及びそれをコードするポリヌクレオチド；種々のDANCE複合体及びその調製方法；DANCEの活性を調節し得る物質又はDANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法、及びそれにより得られる物質；弾性線維形成調節剤；並びにDANCE及びそれをコードするポリヌクレオチドを少なくとも含むキットなどに関する。

【背景技術】

【0002】

弾性線維は、肺・動脈・皮膚等の伸縮性組織に富む、組織の弾性を担う細胞外線維である。ヒトの老化の大きな特徴は、組織の弾性の喪失であり、これにより肺気腫、動脈の硬化と蛇行、皮膚のたるみ等が生じる。これらは高齢化社会において重要性を増している課題であるが、その多くは弾性線維の劣化・断裂が原因である。弾性線維の重要性にもかかわらず、弾性線維の形成および劣化の分子機構に関する詳細は依然として不明である。

【0003】

弾性線維の形成時には、ミクロフィブリルとよばれる線維に沿ってエラスチンが沈着し、リシルオキシダーゼファミリーの酵素〔リシルオキシダーゼ (lysyl oxidase: LOX)、リシルオキシダーゼ様 (lysyl oxidase-like: LOXL) 1-4〕によりエラスチンがクロスリンクされることが重要である（非特許文献1-2）。しかしこの手順がどのような分子機構に基づき生体内で行われているのかについてわかっていることは少ない。また、ミクロフィブリルの本体はフィブリリン1、フィブリリン2、LTBP2 (latent TGF β -binding protein 2) といった細長い高分子量タンパク質であると言われているが、フィブリリン1、フィブリリン2遺伝子のノックアウトマウスはいずれも弾性線維に異常が無いためこれらタンパク質の弾性線維形成への寄与は考えにくく（非特許文献3-5）、LTBP2遺伝子のノックアウトマウスは胎生早期致死であるため、LTBP2が弾性線維形成に寄与しているかどうかは不明である（非特許文献6）。

【0004】

本発明者らは、Signal Sequence Trap法を用いてDANCE (developmental arteries and neural crest epidermal growth factor (EGF)-like; fibulin-5ともいう) という分泌タンパク質をクローニングし（非特許文献7）、そのノックアウトマウスを作成したところ、全身の弾性線維がばらばらになっていることを見出した（非特許文献8）。このためDANCE遺伝子欠損マウスの表現型はヒトの老化に非常に類似しており、皮膚は弾性が無くたるみ、重度の肺気腫をきたし、動脈は蛇行して硬化していた。すなわち、DANCEは弾性線維形成に必須のタンパク質である。また、本発明者らは、DANCEのインテグリンへの結合が生体において重要な役割を果たし得ることを明らかにしている（非特許文献7）。

【0005】

最近、エラスチンをクロスリンクする酵素のひとつ、LOXL1のノックアウトマウスはDANCEノックアウトマウスとよく似て弾性線維の形成異常をきたすことが報告された（非特許文献9）。LOXL1はDANCEと結合すること、DANCEノックアウトマウスではLOXL1は弾性線維上に局在しなくなることから、DANCEはLOXL1酵素をしかるべき位置につなぎ止めておくアダプターとして働くと推測される。LOXL1ノックアウトマウスの表現型はDANCEノックアウトマウスの表現型よりも弱く、やや遅れて出現するため、DANCEの役割はLOXL1をつなぎ止めるだけではないと考えられるが、DANCEがエラスチンクロスリンク酵素の局在を規定するという知見は、DANCEが弾性線維形成に寄与する分子機構を理解する上で重要である。

【0006】

しかし、弾性線維がミクロフィブリルに沿って形成されることを考えると、DANCE がエラスチンクロスリンク酵素と結合するだけでは不十分で、DANCE がミクロフィブリルの構成タンパク質と結合することが必要であると考えられる。しかしながら、DANCE がミクロフィブリルのどのタンパクと結合するのかは依然として不明のままである。DANCE の詳細な機能が明らかになれば、弾性線維形成を調節し得る新たな作用機序を有する医薬の開発が可能になると考えられるため、その機能の解明が切望されている。

【非特許文献1】Molnar, J.ら, Biochim Biophys Acta 1647: 220-4 (2003)

【非特許文献2】Rosenbloom, J.ら, Faseb J. 7: 1208-18. (1993)

【非特許文献3】Pereira, L.ら, Nat. Genet. 17: 218-22 (1997)

【非特許文献4】Putnam, E. A.ら, Nat. Genet. 11: 456-8 (1995)

【非特許文献5】Chaudhry, S. S.ら, Mol. Genet. 10: 835-43 (2001)

【非特許文献6】Shipley, J. M.ら, Mol. Cell Biol. 20: 4879-87 (2000)

【非特許文献7】Nakamura, T.ら, J. Biol. Chem. 274: 22476-83 (1999)

【非特許文献8】Nakamura, T.ら, Nature 415: 171-5 (2002)

【非特許文献9】Liu, X.ら, Nat. Genet. 36: 178-82 (2004)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明は、DANCE の機能の一端を解明することにより、当該解明された機能を利用して、弾性線維形成を調節し得る医薬の開発を可能とするスクリーニング方法、弾性線維形成の状態についての診断方法、当該スクリーニング方法及び診断方法に必要な種々の手段を提供することなどを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、DANCE の一部が生体内で切断されて機能変化をおこすことを見出した。切断型DANCE は、細胞表面インテグリンとの結合能、DANCE 同士の結合能を失い、ミクロフィブリルの構成タンパク質であるLTBP2に対するより強い結合能を獲得する。従って、DANCE の切断は弾性線維形成の調節に重要であると考えられる。

【0009】

また、本発明者らは、DANCE がLTBP2と結合すること、DANCE 同士が結合すること、DANCE がリシルオキシダーゼに結合することなどを見出した。DANCE のこれらタンパク質への結合は弾性線維形成の調節に重要であると考えられる。

【0010】

本発明者らは、以上の知見に基づき本発明を完成した。即ち、本発明は下記の通りである：

<1>配列番号6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、DANCE 特異的プロテアーゼによるDANCE の切断により得られうるポリペプチド。

<2>配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

<3>上記<1>のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

<4>配列番号5で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

<5>配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる、DANCE 特異的プロテアーゼによるDANCE の切断により得られうるポリペプチド。

<6>配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

<7>上記<5>のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

<8>配列番号7で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

<9>DANCE をDANCE 特異的プロテアーゼに接触させることを特徴とする、DANCE の切断方法。

<10>上記<1>又は<2>のポリペプチドに特異的親和性を有する抗体。

<11>上記<5>又は<6>のポリペプチドに特異的親和性を有するモノクローナル抗体。

<12>動物由来の生体試料においてDANCEの切断量を測定することを特徴とする方法。

<13>抗DANCE抗体を含有することを特徴とする、DANCEの切断量の測定用キット。

<14>DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断部位に、当該プロテアーゼに抵抗性を示すようにアミノ酸変異が導入されている、DANCE変異体。

<15>上記<14>のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

<16>少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体。

<17>識別可能な形態である少なくとも2種類のDANCEを含んでなる、上記<16>の複合体。

<18>リシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2をさらに含んでなる上記<16>又は<17>の複合体。

<19>少なくとも1つのDANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2を含んでなるDANCE複合体。

<20>少なくとも2つのDANCEを接触させ、複合体を形成させることを特徴とする、少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体の調製方法。

<21>少なくとも1つのDANCEをリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2に接触させ、複合体を形成させることを特徴とする、少なくとも1つのDANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2を含んでなるDANCE複合体の調製方法。

<22>以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質を、DANCE特異的プロテアーゼに接触させる工程；

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を接触させない場合のDANCE特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

<23>弾性線維形成調節剤を同定するための方法である、上記<22>の方法。

<24>以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質を動物に投与する工程；

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を投与しない場合のDANCE特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。

<25>以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、少なくとも2つのDANCEを含んでなるDANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質の存在下、少なくとも2つのDANCEを接触させる工程；

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程；

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

<26>識別可能な形態である少なくとも2種類のDANCEを用いる、上記<25>の方法。

<27>以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む、少なくとも1つのDANCE、並びにリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2を含んでなるDANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法：

(a) 被検物質の存在下、少なくとも1つのDANCEをリシルオキシダーゼ及び／又はLTBP2に接触させる工程；

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程；

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

<28>上記<23>～<27>のいずれかの方法により得られうる弾性線維形成調節剤

。
<29>DANCEの切断活性を指標とする、DANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法。

<30>上記<29>の方法により得られうるDANCE特異的プロテアーゼ。

<31>上記<29>の方法により得られうるDANCE特異的プロテアーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

<32>上記<30>のDANCE特異的プロテアーゼ、又は上記<31>のポリヌクレオチドを含有する弾性線維形成調節剤。

<33>以下(a)及び(b)を含むキット：

(a) DANCE、又はDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 以下(i)～(vi)の少なくとも1つの成分：

(i) (a)のDANCEと識別可能な形態のDANCE；

(ii) (a)のDANCEと識別可能な形態のDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(iii) リシルオキシダーゼ；

(iv) リシルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(v) LTBP2；

(vi) LTBP2をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【発明の効果】

【0011】

本発明のスクリーニング方法は、弾性線維形成を調節し得る新規作用機序の医薬の開発、又はDANCE特異的プロテアーゼの同定を可能にするため有用である。また、本発明の測定方法は、弾性線維形成の状態の診断を可能とするため有用である。さらに、本発明のポリペプチド、複合体及びキットは、本発明の方法を行うため、弾性線維形成の調節が所望される状態の予防、治療又は改善のため、あるいは研究・診断用試薬などとして好適に用いられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

1. 切断型DANCE、及びそれをコードするポリヌクレオチド

本発明は、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断により得られうるポリペプチド、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0013】

「DANCE」とは、配列番号2で表されるアミノ酸配列、又は配列番号4で表されるアミノ酸配列（配列番号2で表されるアミノ酸配列から推定シグナル配列を除いたアミノ酸配列）からなるポリペプチド、又はそれらの均等物（例えば、SNP、ハプロタイプを含むバリエーション、哺乳動物オルソログなど）をいう。具体的には、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物は、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、且つDANCE特異的プロテアーゼにより切断されるポリペプチドである。本発明では、このようなDANCEがDANCE特異的プロテアーゼにより切断されることを発見し、この知見に基づきDANCEの切断により得られる新規ポリペプチドを提供することに成功した。

【0014】

DANCEの哺乳動物オルソログは特に限定されるものではないが、例えばウシ、ヒツ

ジ、ブタ、ヤギ、サル、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスのオルソログが好ましく、ヒト、サル、ラットまたはマウスのオルソログがより好ましい。

【0015】

本明細書中、「DANCE特異的プロテアーゼ」とは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるDANCEにおいて77番目のアミノ酸と78番目のアミノ酸との間を切断するプロテアーゼをいう。DANCE特異的プロテアーゼは、セリンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンにより阻害され、システインプロテアーゼインヒビターであるE64により阻害されないという特徴を有する。また、DANCE特異的プロテアーゼは、皮膚線維芽細胞、293T細胞、肺組織などでの発現が確認されている。さらにDANCE特異的プロテアーゼは、77番目のアルギニン残基をアラニン残基に置換した変異型DANCEに対する切断能の低下が確認されている。

【0016】

従って、かかるDANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断により得られる本発明のポリペプチドの一方は、配列番号2で表されるアミノ酸配列において24番目から77番目に相当するアミノ酸配列（即ち、配列番号6で表されるアミノ酸配列）からなるポリペプチド、又はその均等物である。具体的には、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物は、配列番号6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0017】

また、本発明により提供されるDANCEの切断により生成する別のポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において78番目から448番目に相当するアミノ酸配列（即ち、配列番号8で表されるアミノ酸配列）からなるポリペプチド、又はその均等物である。具体的には、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物は、配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0018】

配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号6又は配列番号8に示されるアミノ酸配列において1もしくは2以上（例えば1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、最も好ましくは1～5個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列である。

【0019】

また、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列として、配列番号6又は8に示されるアミノ酸配列に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらにより好ましくは約95%以上、いっそうより好ましくは約97%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を用いることもできる。同一性(%)は、当該分野で慣用のプログラム（例えば、BLAST、FASTA等）を初期設定で用いて決定することができる。また、別の局面では、同一性(%)は、当該分野で公知の任意のアルゴリズム、例えば、Needlemanら(1970) (J. Mol. Biol. 48: 444-453)、Myers及びMiller (CABIOS, 1988, 4: 11-17)のアルゴリズム等を使用して決定することができる。Needlemanらのアルゴリズムは、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)のGAPプログラムに組み込まれており、同一性(%)は、例えば、BLOSUM 62 matrix又はPAM250 matrix、並びにgap weight: 16、14、12、10、8、6若しくは4、及びlength weight: 1、2、3、4、5若しくは6のいずれかを使用することによって決定することができる。また、Myers及びMillerのアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラムに組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、例えば、PAM120 weight residue table、gap length penalty 12、gap penalty 4を用いることができる。

【0020】

また、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、それぞれ、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配

列からなるポリペプチドと同質の活性（ここで、「活性」とは機能と同義とする）を保持していることが好ましい。「同質の活性」とは活性が定性的に同等であることを意味し、定量的にも同等であることが好ましいが、許容し得る範囲（例えば、約 0.5～約 2 倍）で異なってもよい。

【0021】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同質の活性としては、例えば、インテグリン結合活性、ホモ複合体形成活性（換言すれば、DANCE 間の結合活性）が挙げられる。従って、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、好ましくは、インテグリン結合部位であるコンセンサス A r g - G l y - A s p (R G D) モチーフ（配列番号 6 で表されるアミノ酸配列において 31 番目～33 番目に相当するアミノ酸配列）、及び／又はホモ複合体形成部位を保持することが好ましい。ホモ複合体形成部位の正確な位置は、欠失解析等の自体公知の方法により同定できる。

【0022】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドの好適な例としては、配列番号 10 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（マウスオルソログ）、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（ラットオルソログ）が挙げられる。

【0023】

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと同質の活性としては、例えば、リシルオキシダーゼ結合活性、リシルオキシダーゼ様-1 結合活性、L T B P 2 結合活性などが挙げられる。従って、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、好ましくは、リシルオキシダーゼ結合部位、リシルオキシダーゼ様-1 (lysyl oxidase-like 1) 結合部位、L T B P 2 (Latent TGF- β -binding protein 2) 結合部位の少なくとも 1 以上、好ましくは 2 以上、より好ましくは全てを保持することが好ましい。例えば、L T B P 2 結合部位は、DANCE の中央にあるカルシウム結合性 EGF (c b E G F) 様モチーフ〔代表的には、(D/N) X (D/N) (E/Q) X_m (D/N) * X_n (Y/F) : ここで、m、n は変数であり、アステリクスは β 水酸化を示す〕が連続するドメインに存在すると考えられるが（例えば、実施例 6 参照）、リシルオキシダーゼ結合部位、リシルオキシダーゼ様-1 結合部位、L T B P 2 結合部位のより正確な位置は、欠失解析等の自体公知の方法により同定できる。

【0024】

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドの好適な例としては、配列番号 12 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（マウスオルソログ）、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（ラットオルソログ）が挙げられる。

【0025】

本発明はまた、配列番号 6 又は配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその均等物をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、DNA 又は RNA のいずれでもよい。

【0026】

配列番号 6 又は配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの好適な例としては、配列番号 5 又は配列番号 7 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。

【0027】

別の局面では、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 5 で表される塩基配列の相補配列に対してハイストリンジェント (high stringent) 条件下でハイブリダイズするが、配列番号 7 で表される塩基配列の相補配列に対してハイストリンジェント条件（好ましくは、中程度 (moderate) のストリンジェント条件）下でハイブリダイズしないポリヌクレオチドである。

【0028】

また、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌクレオチドは、配列番号7で表される塩基配列の相補配列に対してハイストリンジエント条件下でハイブリダイズするが、配列番号5で表される塩基配列の相補配列に対してハイストリンジエント条件（好ましくは、中程度のストリンジエント条件）下でハイブリダイズしないポリヌクレオチドであり得る。

【0029】

上記ハイブリダイゼーションの条件は、既報の条件を参考に設定することができる（Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999）。例えば、ハイストリンジエント条件下でのハイブリダイゼーションの条件としては、 $6\times\text{SSC}$ （sodium chloride/sodium citrate）/45℃の後、 $0.2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}/50\sim65^\circ\text{C}$ での一回以上の洗浄が挙げられる。また、中程度のストリンジエント条件下でのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、 $2\times\text{SSC}/30^\circ\text{C}$ の後、 $1\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}/30\sim50^\circ\text{C}$ での1回以上洗浄が挙げられる。

【0030】

配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌクレオチドの好適な例としては、配列番号9で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド（マウスオルソログ）、配列番号13で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド（ラットオルソログ）が挙げられる。

【0031】

配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌクレオチドの好適な例としては、配列番号11で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド（マウスオルソログ）、配列番号15で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド（ラットオルソログ）が挙げられる。

【0032】

2. 切断型 DANCE、及びそれをコードするポリヌクレオチドの作製方法

2.1. 非切断方法

本発明のポリヌクレオチドは、自体公知の方法により作製できる。例えば、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、その発現部位（例えば、心臓、卵巣、結腸など）から総RNAを抽出し、mRNAからcDNAを調製した後、適切なプライマーを用いてPCRを行うことによりクローニングできる。また、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの均等物をコードするポリヌクレオチドは、上記の通りクローニングしたポリヌクレオチドに変異を導入することにより作製できる。変異導入法としては、例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法（gapped duplex）法、ランダムに点突然変異を導入する方法（例えば、亜硝酸若しくは亜硫酸での処理）、カセット変異法、リンカースキヤニング法、ミスマッチプライマー法などの方法が挙げられる。

【0033】

また、本発明のポリペプチドについても自体公知の方法により作製できる。例えば、上記のように作製した本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込み、得られた組換えベクターを適切な宿主細胞に導入して形質転換体を得た後、形質転換体を培養し、本発明のポリペプチドを産生させ、次いで回収すればよい。本発明はまた、このような組換えベクター、及び当該ベクターが導入された形質転換体をも提供する。

【0034】

発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を発現し、これらポリペプチドを産生できるものであれば特に制限されない。例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等を挙げることができる。

【0035】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロ

モーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

【0036】

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。また、エンハンサー配列、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子（マーカー）を含んでいてもよい。

【0037】

細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーター及びShine-Dalgarno(SD)配列（例えば、AAGGなど）を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。

【0038】

ターミネーター領域、複製可能単位、エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、自体公知のものを用いることができる。

【0039】

選択マーカーとしては、自体公知のものを用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

【0040】

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

【0041】

本発明の組換えベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4 DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素切断部位など）を用いることができる。

【0042】

本発明の形質転換体は、上述の組換えベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

【0043】

形質転換体の作製に用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞（好ましくは、Sf9）などが例示される。

【0044】

発現ベクターの宿主細胞への導入は自体公知の方法を用いて行うことができる。例えば

、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法 (Virology, Vol.52, p.456, 1973)、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法 (Mol. Cell. Biol., Vol.3, p.2156-2165, 1983) によってそれぞれ形質転換することができる。

【0045】

本発明のポリペプチドは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することによって製造することができる。

【0046】

栄養培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

【0047】

形質転換体の培養は自体公知の方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のポリペプチドが大量に生産されるように適宜選択される。

【0048】

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

【0049】

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (Science, Vol.122, p.501, 1952)、DMEM培地 (Virology, Vol.8, p.396, 1959)、RPMI1640培地 (J. Am. Med. Assoc., Vol.199, p.519, 1967)、199培地 (proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.73, p.1, 1950) 等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0050】

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p.8404, 1985) 等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0051】

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

【0052】

宿主がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地 (Millerら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972) 等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

【0053】

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

【0054】

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培地 (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, p.4505, 1980) が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0055】

本発明のポリペプチドは、上述のような形質転換体を培養し、該形質転換体から回収、

好ましくは単離、精製することができる。

【0056】

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0057】

また、タグ（例えば、ヒスチジンタグ、Flagタグ）などを付加したポリペプチドを形質転換体に産生させ、当該タグに親和性を有する物質（例えば、 Ni^{2+} レジン、タグに特異的な抗体）を用いることにより、より簡便に、本発明のポリペプチドを単離、精製することもできる。

【0058】

さらに、本発明のポリペプチドは、無細胞系にて合成可能である。無細胞系による本発明のポリペプチドの合成では、例えば、大腸菌、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽からの抽出液などを使用できる。また、本発明のポリペプチドは、固相合成法、液相合成法等の自体公知の有機化学的方法によって作製できる。

【0059】

2. 2. 切断方法

また、本発明のポリペプチドは、DANCEをDANCE特異的プロテアーゼに接触させ、DANCEを切断することにより得ることができる。本発明はさらに、このような切断方法を提供する。

【0060】

本方法におけるDANCEのDANCE特異的プロテアーゼへの接触は、配列番号2で表されるアミノ酸配列において77番目のアミノ酸と78番目のアミノ酸との間が切断される限り如何なる様式でもよいが、かかる切断を達成する接触の態様としては、例えば、DANCE及びDANCE特異的プロテアーゼの両方を発現する細胞の培養が挙げられる。かかる細胞の培養は、上述した形質転換体の培養に準じて行うことができる。

【0061】

DANCE及びDANCE特異的プロテアーゼの両方を発現する細胞は、この2つのタンパク質を発現する限り特に限定されない。このような細胞は、例えば、DANCE発現細胞（例えば、DANCEを天然で発現する細胞、又は遺伝子操作によりDANCEの発現が可能となった細胞）へのDANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターの導入、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞へのDANCE発現ベクターの導入、任意の細胞へのDANCE発現ベクター及びDANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターの導入などにより作製できる。

【0062】

また、発現を増強させる目的で、DANCE及び／又はDANCE特異的プロテアーゼの発現細胞に、それぞれ、DANCE及び／又はDANCE特異的プロテアーゼの発現ベクターを導入してもよい。

【0063】

DANCE発現細胞は、初代培養細胞、細胞株のいずれでもよい。DANCEの主要な発現部位としては、特に限定されるものではないが、例えば、心臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、小腸、結腸、動脈、肺、子宮、皮膚が知られているので、これら発現部位に相当する組織由来の細胞自体、又はそれから誘導される細胞を、DANCE発現細胞として用いることができる。初代培養細胞、細胞株は、自体公知の方法により作製できる（例えば、Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, Inc. (2001); 機能細胞の分離と培養, 丸善書店 (1987) 参照）。

【0064】

DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞についても、初代培養細胞、細胞株のいずれでもよい。例えば、皮膚線維芽細胞、293T細胞などの細胞、並びに肺、皮膚などの組織においてDANCE特異的プロテアーゼの発現が確認されているので、これらの細胞自体、又はこれらの組織由来の細胞、あるいはそれらから誘導される細胞を、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞として用いることができる。また、ある細胞がDANCEの切断活性を有するか否かを評価した結果、DANCEの切断活性を有することが明らかになった細胞についても同様に、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞として用いることができる。

【0065】

本切断方法で用いられる細胞種としては、上述した形質転換体の作製に用いられる宿主と同種の細胞を用いることができるが、なかでも、昆虫細胞、動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）が好ましい。

【0066】

DANCE発現ベクターは、本発明のポリペプチドを発現するベクターと同様の方法により作製できる。

【0067】

DANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターは、後述するDANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法に記載される方法により作製できる。なお、DANCE特異的プロテアーゼ発現ベクターは、後述の発現スクリーニングにおける、DANCE特異的発現ベクターが濃縮された形質転換体から得られる、DANCE特異的プロテアーゼ以外の遺伝子産物発現ベクターとの混合物であってもよい。

【0068】

本切断方法における接触の別の態様としては、DANCE特異的プロテアーゼ含有画分へのDANCEの添加が挙げられる。DANCE特異的プロテアーゼ含有画分は、DANCEの切断活性を有する限り特に限定されず、例えば、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞の培養上清、当該細胞の抽出液、DANCE特異的プロテアーゼを発現する組織の抽出液、当該培養上清や抽出液からの粗精製液などが挙げられる。また、DANCE特異的プロテアーゼが単離精製された場合には、DANCE含有画分又は単離されたDANCEと単離されたDANCE特異的プロテアーゼとの混合により、DANCEの切断が可能となる。

【0069】

DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断は、抗DANCE抗体を用いた免疫学的手法（例えば、免疫沈降法、ウエスタンブロッティング）などにより確認できる。

【0070】

本切断方法は、本発明のポリペプチドの作製のみならず、本発明のスクリーニング方法における指標としても有用である。

【0071】

3. DANCEの切断により生じるN末端側及びC末端側ポリペプチドに対する抗体

本発明はまた、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断により生じる、N末端側のポリペプチド（即ち、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又はその均等物）に対する抗体、並びにC末端側のポリペプチド（即ち、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又はその均等物）に対する抗体を提供する。

【0072】

本発明の抗体の作製に用いられる抗原としては、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその均等物、あるいはそれらの部分ペプチドを用いることができる。部分ペプチドとしては、抗原性を有する限り特に限定されないが、例えば、配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列、又は配列番号6又は配列番号8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から選ばれる少なくとも6個、

好ましくは少なくとも8個、より好ましくは少なくとも10個、さらにより好ましくは少なくとも15個以上の連続したアミノ酸からなるペプチドであり得る。

【0073】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよく、周知の免疫学的手法により作製することができる。この抗体は、完全な抗体分子だけでなく、本発明のタンパク質に対する抗原結合部位(CDR)を有する限りいかなるフラグメントであってもよく、例えば、Fab、F(ab')₂、ScFv、minibody等が挙げられる。

【0074】

例えば、ポリクローナル抗体は、上記抗原(必要に応じて、ウシ血清アルブミン、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) 等のキャリア蛋白質に架橋した複合体とすることもできる)を、市販のアジュバント(例えば、完全または不完全フロイントアジュバント)とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2~3週間おきに2~4回程度投与し(部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測定し、その上昇を確認しておく)、最終免疫から約3~10日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が挙げられる。

【0075】

また、モノクローナル抗体は、細胞融合法により作成することができる。例えば、マウスに上記抗原を市販のアジュバントと共に2~4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の3日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞(例えば、NS-1、P3X63Ag8など)を細胞融合して該因子に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合はPEG法でも電圧パルス法であってもよい。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知のEIAまたはRIA法等を用いて抗原と特異的に結合する抗体を、培養上清中から検出することにより選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、またはマウスもしくはラット、好ましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれハイブリドーマの培養上清および動物の腹水から取得することができる。

【0076】

さらに、本発明の抗体は、キメラ抗体、ヒト化、ヒト型、キメラ抗体であってもよい。キメラ抗体は、例えば「実験医学(臨時増刊号), Vol.1.6, No.10, 1988」、特公平3-73280号公報等を、ヒト化抗体は、例えば特表平4-506458号公報、特開昭62-296890号公報等を、ヒト抗体は、例えば「Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997」、「Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994」、特表平4-504365号公報、国際出願公開W094/25585号公報、「日経サイエンス、6月号、第40~第50頁、1995年」、「Nature, Vol.368, p.856-859, 1994」、特表平6-500233号公報等を参考にそれぞれ作製することができる。

【0077】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの一方を特異的に検出又は阻害できるため、例えば、本発明のスクリーニング方法を行うため、並びに弾性線維形成調節剤及びDANCEに関する研究・診断用試薬として有用である。

【0078】

4. DANCE切断量及び切断活性の測定方法、キット

本発明は、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCE切断量及び/又は切断活性を測定することを特徴とする方法、なかでも、動物由来の生体試料において、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCE切断量を測定することを特徴とする方法、ならびに当該測定を可能とするキットを提供する。

【0079】

本方法において、動物由来の生体試料が用いられる場合、使用される動物は、温血動物である限り特に限定されないが、例えば、哺乳動物であり得る。哺乳動物は特に限定されるものではないが、例えばヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、サル、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスが挙げられる。

【0080】

生体試料は、上記動物から採取可能なものである限り特に限定されない。生体試料としては、例えば、皮膚、動脈、肺、子宮等の組織から採取したものが挙げられる。

【0081】

DANCE切断量は、自体公知の方法により測定できる。例えば、DANCE切断量は、抗DANCE抗体を用いる免疫学的手法（例えば、ウエスタンブロッティング）により測定できる。この場合、上述した本発明の抗体に限らず、任意の抗DANCE抗体（例えば、DANCEの切断部位にまたがる部分ペプチドを抗原として用いて作製した抗体）を使用できる。かかる抗体は、上述した抗体の作製方法に準じて作製できる。

【0082】

DANCE切断量の測定に抗DANCE抗体を用いる場合、例えば、標識された抗DANCE抗体の使用、あるいは抗DANCE抗体と標識された2次抗体の併用により、DANCE切断量が測定できる。

【0083】

抗DANCE抗体の標識としては、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等の酵素、蛍光物質などが挙げられる。これらの標識と抗DANCE抗体との結合は自体公知の方法、例えば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより行なうことができる。

【0084】

標識が酵素である場合、基質としては、選択した酵素に応じて適当なものが選ばれる。例えば、酵素としてアルカリホスファターゼを選択した場合においてはp-ニトロフェニルホスフェート（PNPP）等が挙げられ、この際の発色剤としてo-フェニレンジアミン（OPD）、テトラメチルベンチジン（TMB）などが使用される。また、洗浄液、反応停止液、基質溶解液についても、選択した酵素に応じて、従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

【0085】

また、DANCE切断活性は、例えば、DANCE切断部位を有するポリペプチドの一端に蛍光分子、もう一端にクエンチャーを結合しておき、切断が生じた際にのみ蛍光を発するシステムを構築、使用することにより、測定できる。このようなシステムの構築は、自体公知の方法により行うことができる。

【0086】

DANCE切断活性の測定に用いられる蛍光分子としては、DANCE切断活性を評価し得る限り特に限定されるものではないが、例えば、FITC、6-FAM、HEX、TET、EDANS、Alexa（登録商標）Fluor（Invitrogen）などが挙げられる。

【0087】

DANCE切断活性の測定に用いられるクエンチャーとしては、DANCE切断活性を評価し得る限り特に限定されるものではないが、例えば、TAMRA、Dabcyl、Eclipse、QSYクエンチャー色素（Invitrogen）などが挙げられる。

【0088】

本発明の測定方法は、例えば、本発明のスクリーニング方法を行うため、並びに弾性線維形成の状態についての診断、特に分子レベルでの解析を可能とするため有用である。

【0089】

また、本発明は、DANCE切断量及び／又は切断活性の測定を可能とするキットに関する。

【0090】

DANCE切断量の測定を可能にする本発明のキットは、上述した抗DANCE抗体に加え、DANCE、2次抗体、標識酵素に対する基質、生体試料の処理に必要な試薬などを含むことができる。このキットはまた、DANCEの切断により生じるポリペプチド（即ち、本発明のポリペプチド）の一方、両方をコントロールとして含むことができる。こ

のキットはさらに、DANCE切断量が弾性線維形成の指標となり得る旨を記載している説明書を含んでいてもよい。

【0091】

DANCE切断活性の測定を可能にする本発明のキットは、DANCE、蛍光分子、クエンチャーなどを含むことができる。このキットはまた、上述したDANCE変異体をコントロールとして含むことができる。このキットはさらに、DANCE切断活性が弾性線維形成の指標となり得る旨を記載している説明書を含んでいてもよい。

【0092】

本発明の測定用キットは、DANCE切断量及び／又は切断活性を簡便に測定し得る手段を提供するため有用である。

【0093】

5. DANCE変異体、それをコードするポリヌクレオチド

また、本発明は、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断部位に、当該プロテアーゼに抵抗性を示すようにアミノ酸変異が導入されているDANCE変異体、又は当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0094】

本発明のDANCE変異体は、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、あるいは配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列において、DANCE特異的プロテアーゼに抵抗性を示すようにプロテアーゼ切断部位 (Arg-Gly: 配列番号2で表されるアミノ酸配列において77番目～78番目のアミノ酸、および配列番号4で表されるアミノ酸配列において54番目～55番目のアミノ酸に相当) 又はその近傍のアミノ酸 (例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列において70番目～85番目、好ましくは72番目～83番目、より好ましくは74番目～81番目、さらにより好ましくは76番目～79番目のアミノ酸、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において47番目～62番目、好ましくは49番目～60番目、より好ましくは51番目～59番目、さらにより好ましくは53番目～56番目のアミノ酸) が変異 (例えば、欠失、付加、置換) していることを特徴とする。ここで、「実質的に同一」は、上述したものと同義である。

【0095】

「DANCE特異的プロテアーゼに抵抗性を示す」とは、DANCE特異的プロテアーゼによるDANCEの切断能が、変異後においてより低下 (例えば75%以下、好ましくは50%以下の低下) することを意味し、切断能の低下の程度は特に限定されない。DANCE変異体がDANCE特異的プロテアーゼに対して抵抗性を示すか否かは、上述した切断方法による正常DANCE、DANCE変異体の切断処理後、正常DANCE、DANCE変異体の切断量を測定・比較することで確認できる。

【0096】

本発明のDANCE変異体としては、例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、又は配列番号2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列において、77番目のアルギニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、並びに、配列番号4で表されるアミノ酸配列において、又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列において、54番目のアルギニンがアラニンに置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

【0097】

本発明はまた、本発明のDANCE変異体を含む組換えベクター、当該ベクターを含む形質転換体を提供する。

【0098】

本発明のDANCE変異体及び当該変異体をコードするポリヌクレオチドは、例えば、本発明のスクリーニング方法におけるネガティブコントロールとして、並びに弾性線維形成調節剤及び研究用試薬として有用である。

【0099】

6. DANCE 複合体

6. 1. 少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体 (複合体 I)

本発明は、少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体 (複合体 I) を提供する。

【0100】

本複合体 I は、リシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 をさらに含んでもよい。リシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 は、後述の通り調製できる。

【0101】

本複合体 I はまた、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様-1 をさらに含んでもよい。本発明において使用できるインテグリンとしては種々のインテグリンが挙げられるが、なかでも $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 1 \text{ I b } \beta 3$ 、全ての $\alpha \text{ v } \beta$ 、 $\alpha 9 \beta 1$ が好ましい。これらインテグリン及びリシルオキシダーゼ様-1、及びその発現部位は公知であり、遺伝子のクローニング、発現細胞の調製は、自体公知の方法により行うことができる。

【0102】

好ましくは、本複合体 I は、識別可能な形態である少なくとも 2 種類の DANCE を含んでなる。ここで、「識別可能な形態」とは、少なくとも 2 つの DANCE に差異が存在し、当該差異が検出可能であることを意味する。DANCE の識別可能な形態の組合せとしては、標識 DANCE と非標識 DANCE との組合せ、2 つの異なる標識 DANCE の組合せが例示される。

【0103】

DANCE の標識は、標識体を非標識体又は異種標識体と識別可能である限り特に限定されないが、例えば、エピトープによる標識、放射性同位体 (例えば、 ^{35}S) による標識が挙げられる。

【0104】

DANCE の標識に用いられるエピトープとしては、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、インフルエンザヘマグルチニン (HA)、チオレドキシシン (Trx)、ヒスチジン (His) タグ、FLAG タグ、Myc タグなどが挙げられる。

【0105】

本発明の複合体 I が、さらにリシルオキシダーゼ、LTBP 2、インテグリン、リシルオキシダーゼ様-1 から選ばれる 1 以上を含んでなる場合、それらは標識されていても標識されていなくともよい。

【0106】

エピトープ標識 DANCE は、自体公知の方法により作製できる。例えば、エピトープをコードしているヌクレオチドに DANCE をコードするポリヌクレオチドを適切に連結して、DNA 構築物を作製し、この DNA 構築物を宿主細胞で発現させることによりエピトープ標識 DANCE を調製できる。一方、放射性同位体 (例えば、 ^{35}S) 標識 DANCE は、DANCE 発現細胞を放射性同位体含有培地で培養することで調製できる。

【0107】

本発明はまた、上述の複合体 I の調製方法を提供する。複合体 I の調製方法は、少なくとも 2 つの DANCE を接触させ、複合体を形成させることを特徴とする。

【0108】

また、複合体 I の調製の際、リシルオキシダーゼ及び／又は LTBP 2 をさらに接触させてもよい。さらに、インテグリン及び／又はリシルオキシダーゼ様-1 を接触させることもできる。

【0109】

複合体 I の形成は、DANCE の調製により (即ち、DANCE の調製に伴う必然的な会合)、あるいは別々に調製した少なくとも 2 種の DANCE (標識 DANCE - 非標識 DANCE、2 つの異なる標識 DANCE) の接触により達成できる。

【0110】

より具体的には、複合体 I の形成は、単離された DANCE に対する単離された DANCE (例えば、識別可能な形態) の接触、及び DANCE 発現細胞に対する DANCE 発現ベクターの導入 (インビトロ、インビボを含む) などにより達成できる。

【0111】

複合体 I、特に、識別可能な形態である少なくとも 2 種類の DANCE を含んでなる複合体、及び当該複合体の調製方法は、DANCE 複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法における指標として、並びに弾性線維形成調節剤及び DANCE に関する研究用試薬として有用である。

【0112】

6. 2. 少なくとも 1 つの DANCE 及びリシルオキシダーゼを含んでなる DANCE 複合体 (複合体 II)

本発明は、少なくとも 1 つの DANCE 及びリシルオキシダーゼを含んでなる DANCE 複合体 (複合体 II) を提供する。

【0113】

本複合体 II は、DANCE (例えば、識別可能な形態の DANCE) 及び/又は LTBP2 をさらに含んでいてもよい。本複合体 II はまた、インテグリン及び/又はリシルオキシダーゼ様-1 をさらに含んでいてもよい。なお、LTBP2、インテグリン、リシルオキシダーゼ様-1 は、それぞれ、上述したように標識されていても標識されていなくともよい。

【0114】

本発明はまた、上述の複合体 II の調製方法を提供する。複合体 II の調製方法は、少なくとも 1 つの DANCE をリシルオキシダーゼに接触させ、複合体を形成させることを特徴とする。

【0115】

また、複合体 II の調製の際、DANCE (例えば、識別可能な形態の DANCE) 及び/又は LTBP2 をさらに接触させてもよい。さらに、インテグリン及び/又はリシルオキシダーゼ様-1 を接触させることもできる。

【0116】

複合体 II の形成は、例えば、未標識 DANCE と未標識リシルオキシダーゼの接触、未標識 DANCE と標識リシルオキシダーゼの接触、標識 DANCE と未標識リシルオキシダーゼの接触、同種の標識をそれぞれ有する DANCE とリシルオキシダーゼの接触、あるいは異なる標識をそれぞれ有する DANCE とリシルオキシダーゼの接触により達成できる。

【0117】

より具体的には、複合体 II の形成は、単離された DANCE と単離されたリシルオキシダーゼの接触、並びに DANCE 発現細胞に対するリシルオキシダーゼ発現ベクターの導入、及びリシルオキシダーゼ発現細胞に対する DANCE 発現ベクターの導入 (インビトロ、インビボを含む) などにより達成できる。

【0118】

リシルオキシダーゼ、及びその発現部位は公知である。従って、リシルオキシダーゼ発現ベクター、及びリシルオキシダーゼ発現細胞 (例えば、初代培養細胞、細胞株) は、自体公知の方法により作製できる。例えば、リシルオキシダーゼは、血管平滑筋、皮膚、線維芽細胞などの細胞、並びに動脈、皮膚、肺、子宮などの組織において発現が確認されているので、これら細胞、組織よりリシルオキシダーゼ遺伝子がクローニングでき、また、リシルオキシダーゼ発現細胞が調製できる。

【0119】

複合体 II、及び当該複合体の調製方法は、DANCE 複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法における指標として、並びに弾性線維形成調節剤及び DANCE に関する研究用試薬として有用である。

【0120】

6. 3. 少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体(複合体III)

本発明は、少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体(複合体III)を提供する。

【0121】

本複合体IIIは、DANCE(例えば、識別可能な形態のDANCE)及び/又はリシルオキシダーゼをさらに含んでいてもよい。本複合体IIIはまた、インテグリン及び/又はリシルオキシダーゼ様-1をさらに含んでいてもよい。なお、リシルオキシダーゼ、インテグリン、リシルオキシダーゼ様-1は、それぞれ、上述したように標識されていても標識されていなくともよい。

【0122】

本発明はまた、上述の複合体IIIの調製方法を提供する。複合体IIIの調製方法は、少なくとも1つのDANCEをLTBP2に接触させ、複合体を形成させることを特徴とする。

【0123】

また、複合体IIIの調製の際、DANCE(例えば、識別可能な形態のDANCE)及び/又はリシルオキシダーゼをさらに接触させてもよい。さらに、インテグリン及び/又はリシルオキシダーゼ様-1を接触させることもできる。

【0124】

複合体IIIの形成は、例えば、未標識DANCEと未標識LTBP2の接触、未標識DANCEと標識LTBP2の接触、標識DANCEと未標識LTBP2の接触、同種の標識をそれぞれ有するDANCEとLTBP2の接触、あるいは異なる標識をそれぞれ有するDANCEとLTBP2の接触により達成できる。

【0125】

より具体的には、複合体IIIの形成は、単離されたDANCEと単離されたLTBP2の接触、並びにDANCE発現細胞に対するLTBP2発現ベクターの導入、及びLTBP2発現細胞に対するDANCE発現ベクターの導入(インビトロ、インビボを含む)などにより達成できる。

【0126】

LTBP2、及びその発現部位は公知である。従って、LTBP2発現ベクター、及びLTBP2発現細胞(例えば、初代培養細胞、細胞株)は、自体公知の方法により作製できる。例えば、LTBP2は、血管平滑筋細胞、皮膚線維芽細胞などの細胞、並びに動脈、皮膚、肺、子宮などの組織において発現が確認されているので、これら細胞、組織よりLTBP2遺伝子がクローニングでき、また、LTBP2発現細胞が調製できる。

【0127】

複合体III、及び当該複合体の調製方法は、DANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法における指標として、並びに弾性線維形成調節剤及びDANCEに関する研究用試薬として有用である。

【0128】

7. スクリーニング方法

本発明は、種々のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法(スクリーニング方法I、II)、DANCE複合体の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法(スクリーニング方法III~V)、DANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法(スクリーニング方法VI)に大別される。以下、それぞれのスクリーニング方法について詳述する。

【0129】

7. 1. DANCE特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法(インビトロ)(スクリーニング方法I)

スクリーニング方法Iは、動物を用いずにDANCE特異的プロテアーゼの活性を評価

できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む：

(a) 被検物質を、DANCE 特異的プロテアーゼに接触させる工程：

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を接触させない場合の DANCE 特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。なお、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質は、いわゆる DANCE 特異的プロテアーゼのアゴニスト、アンタゴニストのみならず、本スクリーニング方法 I の性質上、DANCE 特異的プロテアーゼの発現量を変動させ得る物質をも含む。

【0130】

工程 (a) において、被検物質としては、いかなる公知化合物及び新規化合物であつてもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

【0131】

被検物質の DANCE 特異的プロテアーゼへの接触は、「2. 2. 切断方法」で言及した接触と同様である。

【0132】

工程 (b) において、DANCE 特異的プロテアーゼの活性は、DANCE 切断量及び／又は切断活性に基づいて評価できる。例えば、DANCE 切断量及び切断活性は、「4. DANCE 切断量及び切断活性の測定方法、キット」で言及した方法により測定できる。

【0133】

DANCE 切断量及び／又は切断活性の比較は、被検物質の存在下、不在下において、DANCE 切断量及び／又は切断活性における有意差の有無に基づいて行なわれる。なお、被検物質の不在下における DANCE 切断量及び／又は切断活性は、被検物質の存在下における DANCE 切断量及び／又は切断活性の測定に対し、事前に測定したものであつても、同時に測定したものであつてもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

【0134】

次いで、工程 (c) において、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。

【0135】

7. 2. DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質のスクリーニング方法 (インピボ) (スクリーニング方法 II)

スクリーニング方法 II は、動物を用いて DANCE 特異的プロテアーゼの活性を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む：

(a) 被検物質を動物に投与する工程：

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 特異的プロテアーゼの活性を測定し、該活性を被検物質を投与しない場合の DANCE 特異的プロテアーゼの活性と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 特異的プロテアーゼの活性の調節をもたらす被検物質を選択する工程。なお、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節し得る物質は、いわゆる DANCE 特異的プロテアーゼのアゴニスト、アンタゴニストのみならず、本スクリーニング方法 II の性質上、DANCE 特異的プロテアーゼの発現量を変動させ得る物質をも含む。

【0136】

工程 (a) において、被検物質としては、スクリーニング方法 I と同様のものを用いることができる。

【0137】

被検物質の動物への投与は、自体公知の方法により行なわれる。投与量・頻度、投与期間は、任意に設定できる。なお、本方法が適用される動物は、「4. DANCE 切断量の測定方法、キット」で言及した動物と同様である。

【0138】

工程 (b) において、DANCE 特異的プロテアーゼの活性は、例えば、対象動物からの生体試料の採取後、当該生体試料における DANCE 切断量に基づいて評価できる。生体試料、DANCE 切断量の測定方法は、「4. DANCE 切断量及び切断活性の測定方法、キット」で言及したものと同様である。

【0139】

DANCE 切断量の比較は、被検物質の投与時、非投与時において、DANCE 切断量における有意差の有無に基づいて行なわれる。なお、被検物質の非投与時における DANCE 切断量は、被検物質の投与時における DANCE 切断量の測定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

【0140】

次いで、工程 (c) において、DANCE 特異的プロテアーゼの活性を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。

【0141】

7. 3. 少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体 (複合体 I) の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法 (スクリーニング方法 I I I)

スクリーニング方法 I I I は、複合体 I の形成を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む：

(a) 被検物質の存在下、少なくとも 2 つの DANCE を接触させる工程：

(b) 上記 (a) の工程に起因して生じる DANCE 複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下における DANCE 複合体の量と比較する工程；

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、DANCE 複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

【0142】

工程 (a) において、被検物質としては、スクリーニング方法 I と同様のものを用いることができる。

【0143】

少なくとも 2 つの DANCE の接触は、「6. 1. 少なくとも 2 つの DANCE を含んでなる DANCE 複合体 (複合体 I)」で言及した接触と同様である。なお、本スクリーニング方法 I I I では、識別可能な形態の DANCE を用いることが好ましい。

【0144】

工程 (b) において、複合体 I の量は、例えば、免疫沈降法 (例えば、実施例 6 参照) とデンシトメトリーの併用、表面プラズモン共鳴等の相互作用解析法、ELISA に準じる方法などにより測定できる。

【0145】

複合体 I の量の比較は、被検物質の存在下、不在下において、複合体 I の量における有意差の有無に基づいて行なわれる。なお、被検物質の不在下における複合体 I の量は、被検物質の存在下における複合体 I の量の測定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

【0146】

次いで、工程 (c) において、複合体 I の形成を調節する被検物質が選択される。この

ように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。

【0147】

7. 4. 少なくとも1つのDANCE及びリシルオキシダーゼを含んでなるDANCE複合体(複合体II)の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法(スクリーニング方法IV)

スクリーニング方法IVは、複合体IIの形成を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む:

(a) 被検物質の存在下、少なくとも1つのDANCEをリシルオキシダーゼに接触させる工程;

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程;

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

【0148】

工程(a)において、被検物質としては、スクリーニング方法Iと同様のものを用いることができる。

【0149】

少なくとも1つのDANCEとリシルオキシダーゼの接触は、「6. 2. 少なくとも1つのDANCE及びリシルオキシダーゼを含んでなるDANCE複合体(複合体I)」で言及した接触と同様である。

【0150】

工程(b)において、複合体IIの量は、免疫沈降法(例えば、実施例7参照)とデンストメトリーの併用、表面プラズモン共鳴等の相互作用解析法、ELISAに準じる方法などにより測定できる。

【0151】

複合体IIの量の比較は、被検物質の存在下、不在下において、複合体IIの量における有意差の有無に基づいて行なわれる。なお、被検物質の不在下における複合体IIの量は、被検物質の存在下における複合体IIの量の測定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

【0152】

次いで、工程(c)において、複合体IIの形成を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。

【0153】

7. 5. 少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体(複合体III)の形成を調節し得る物質のスクリーニング方法(スクリーニング方法V)

スクリーニング方法Vは、複合体IIIの形成を評価できる限り特に限定されないが、例えば、以下の工程(a)、(b)及び(c)を含む:

(a) 被検物質の存在下、少なくとも1つのDANCEをLTBP2に接触させる工程;

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるDANCE複合体の量を測定し、該量を被検物質の不在下におけるDANCE複合体の量と比較する工程;

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、DANCE複合体の形成を調節する被検物質を選択する工程。

【0154】

工程(a)において、被検物質としては、スクリーニング方法Iと同様のものを用いることができる。

【0155】

少なくとも1つのDANCEとLTBP2の接触は、「6. 3. 少なくとも1つのDANCE及びLTBP2を含んでなるDANCE複合体(複合体III)」で言及した接触と同様である。

【0156】

工程 (b) において、複合体 I I I の量は、免疫沈降法 (例えば、実施例 6 参照) とデンストメトリーの併用、表面プラズモン共鳴等の相互作用解析法、E L I S A に準じる方法などにより測定できる。

【0157】

複合体 I I I の量の比較は、被検物質の存在下、不在下において、複合体 I I I の量における有意差の有無に基づいて行なわれる。なお、被検物質の不在下における複合体 I I I の量は、被検物質の存在下における複合体 I I I の量の測定に対し、事前に測定したものであっても、同時に測定したものであってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定したものが好ましい。

【0158】

次いで、工程 (c) において、複合体 I I I の形成を調節する被検物質が選択される。このように選択された被検物質は、弾性線維形成調節剤又は研究用試薬として有用である。

【0159】

7. 6. DANCE 特異的プロテアーゼのスクリーニング方法 (スクリーニング方法 V I)

スクリーニング方法 V I は、DANCE の切断活性を指標に、DANCE 特異的プロテアーゼをスクリーニングすることの特徴とする。

【0160】

DANCE 特異的プロテアーゼは、例えば、当該プロテアーゼを発現する細胞より得ることができる。DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞は、「2. 2. 切断方法」で言及した細胞と同様である。

【0161】

例えば、スクリーニング方法 V I として、発現クローニングの方法を用いることができる (例えば、Molecular Cloning (第 2 版); Current protocols in Molecular Biology (第 3 版), Acad. Press (1993); Antibody Engineering: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996) 参照)。

【0162】

具体的には、DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞より c D N A を調製し、該 c D N A を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え発現ベクターを作製し、c D N A ライブラリーを作製する。組換え発現ベクターを、該ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞に由来する遺伝子産物を発現する形質転換体を作製し、この形質転換体のなかから DANCE 特異的プロテアーゼを産生する形質転換体を選択する。次いで、DANCE 特異的プロテアーゼを産生する形質転換体に導入した c D N A にコードされている遺伝子配列を決定することにより、DANCE 特異的プロテアーゼを取得することができる。

【0163】

本スクリーニング方法 V I で用いられる宿主細胞としては、DANCE の切断活性を有していないか、又は DANCE の切断活性が極めて低い細胞であれば如何なる細胞でも用いることができる。ある細胞が DANCE の切断活性を有するか否かは、当該細胞に DANCE 発現ベクターを導入し、発現された DANCE の切断の有無を確認することにより評価できる。

【0164】

c D N A の作製に用いられる細胞としては、DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞、例えば、皮膚線維芽細胞、293T 細胞、動脈平滑筋細胞などの細胞、並びに肺組織、子宮組織などの組織由来の細胞が用いられる。

【0165】

c D N A ライブラリーの調製は、自体公知の方法により行なわれる。先ず、DANCE 特異的プロテアーゼ発現細胞から、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホ

ルム (AGPC) 法等の方法により全RNAを調製する。次いで、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法等の方法により、又は市販のキット (例えば、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)) を用いて、mRNAを調製する。次いで、調製したmRNAからcDNAライブラリーを作製する (例えば、Molecular Cloning (第2版)、Current protocols in Molecular Biology (第3版) 参照)。cDNAライブラリーの作製に用いられる発現ベクターとしては、用いる宿主細胞においてインサートの発現が可能である限り特に限定されない。

【0166】

作製したcDNAライブラリーをそのまま用いてもよいが、目的とする遺伝子を濃縮するために、DANCE特異的プロテアーゼを発現していない細胞のmRNAを用い、サブトラクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5783 (1988)) を行なって作製したcDNAライブラリーを用いることもできる。

【0167】

また、DANCEを発現していない細胞を宿主細胞として選択した場合には、上記の通り調製されたcDNAライブラリーに加えて、DANCE発現ベクターもまた宿主細胞に導入される。組換えベクターの宿主細胞への導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法が挙げられる。

【0168】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養することにより、導入したcDNAがコードする遺伝子産物を発現させることができる。形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。例えば、培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、 α MEM培地、DMEM培地、199培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH 6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行われる。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0169】

本スクリーニング方法VIでは、上述した形質転換体の培養後、培養上清においてDANCEの切断の有無又は程度をウエスタンブロッティング等の方法により確認することで、DANCE特異的プロテアーゼを産生する形質転換体を選択することができる。必要に応じて、上述の工程を複数繰り返すことで、DANCE特異的発現ベクターが濃縮された形質転換体を得ることができる。選択した形質転換体に導入したcDNAの単離、および単離したcDNAの遺伝子配列の決定は、自体公知の方法により行うことができる。なお、本発明はまた、このように取得されたDANCE特異的プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドについても提供する。

【0170】

スクリーニング方法VIは、発現クローニングの方法以外でも行うことができる。具体的には、DANCE特異的プロテアーゼ発現細胞の抽出液又は培養上清を調製し、DANCEの切断活性を指標として該抽出液又は培養上清を分画することにより、DANCE特異的プロテアーゼを精製することができる。精製方法としては、例えば、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、陰イオン交換クロマトグラフィー法、陽イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法、あるいはこれら方法の組合せが挙げられる。

【0171】

また、ヒト等のゲノム解析が完了した現在では、データベースに登録されている配列、発現部位等の情報、相同性検索等の手段に基づきプロテアーゼをクローニングし、当該プロテアーゼにつきDANCE切断活性を逐一評価することで、DANCE特異的プロテアーゼをスクリーニングすることもできる。なお、DANCE特異的プロテアーゼは、セリ

ンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニンにより阻害されるという知見が得られている。従って、本スクリーニング方法では、効率性重視の観点から、セリンプロテアーゼが優先的にスクリーニングされる。

【0172】

本スクリーニング方法VIは、DANCE特異的プロテアーゼのスクリーニングを可能にするため有用である。また、当該スクリーニング方法により得られるDANCE特異的プロテアーゼは、弾性線維形成調節剤として、DANCEの切断において、並びに本発明のスクリーニング方法を行うために有用である。

【0173】

8. キット

また、本発明は、以下(a)及び(b)を含むキットを提供する:

(a) DANCE、又はDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド;

(b) 以下(i)~(vi)の少なくとも1つの成分:

(i) (a)のDANCEと識別可能な形態のDANCE;

(ii) (a)のDANCEと識別可能な形態のDANCEをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド;

(iii) リシルオキシダーゼ;

(iv) リシルオキシダーゼをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド;

(v) LTBP2;

(vi) LTBP2をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【0174】

また、本発明のキットは、弾性線維形成を調節するために、又はスクリーニングを行うために使用すべき、又は使用されうることなどを記載する説明書を含むことができる。

【0175】

本発明のキットはまた、上記成分に加え、インテグリン、インテグリンをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、リシルオキシダーゼ様-1、リシルオキシダーゼ様-1をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含んでいてもよい。これらは、自体公知の方法により作製できる。

【0176】

本発明のキットはさらに、上記成分に加え、DANCE、リシルオキシダーゼ、LTBP2、インテグリン、リシルオキシダーゼ様-1に対する抗体を含んでいてもよい。これら抗体は、上述した抗体の作製法に準じて作製できる。

【0177】

本発明のキットは、上記スクリーニング方法I~VI、及びDANCEに関連する他の研究などを行い得る簡便な手段の提供を可能にするため、並びに、弾性線維形成調節剤として有用である。

【0178】

9. 弾性線維形成調節剤

本発明の調節剤は、本発明のポリペプチド、抗体、DANCE変異体、複合体又は当該複合体を構成する複数の成分、DANCE特異的プロテアーゼ、あるいはこれらをコードするポリヌクレオチドなどを含有する。

【0179】

本発明の調節剤は、任意の担体、例えば、医薬上許容される担体を配合することにより弾性線維形成の調節が所望される状態の予防、治療又は改善などのために用いることができる。

【0180】

例えば、本発明の調節剤が、弾性線維の形成を促進する成分を含む場合、当該調節剤は、弾性線維形成の調節が所望される状態、例えば、肺気腫、血管損傷、皮膚弛緩症、創傷、弾性線維劣化(例えば、加齢又は紫外線により引き起こされるもの)、肌荒れ、動脈硬化、大動脈瘤の予防、治療又は改善のため、あるいは美容の目的のために有用である。

【0181】

一方、本発明の調節剤が、弾性線維の形成を抑制する成分を含む場合、当該調節剤は、弾性線維形成の抑制が所望される状態、例えば心筋梗塞の予防、治療又は改善のために有用である。

【0182】

医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム－グリコーラースターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0183】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量のリガンドを懸濁させた懸濁液剤、有効量のリガンドを溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

。

【0184】

非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

【0185】

本発明の製剤の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.001～約100mg/kgである。

【0186】

本明細書中で挙げられた全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【0187】

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0188】

1. 材料及び方法

1. 1. 発現プラスミドの構築

本発明で用いた発現プラスミドは、下記の通り作製した。なお、これらコンストラクトはすべて塩基配列を確認した後、発現実験に用いた。

pEF6/ssFLAG:

pEF6/V5-Aプラスミド (Invitrogen) のKpn I - Pme I部位に、合成ヌクレオチドggtacc gtagcgaattcaccatgtctgcacttctgacatctgctctgttgaggctgcagttgctgactacaaagacgatgacga caagactagtcacatcaccatcaccattctagagaaggatccgatatccgcgccgcatcgattgactagctgaggccg caaaccc (配列番号 17) およびその相補鎖合成ヌクレオチドを組み込んだ。これにより、Kpn I - Nhe I - EcoRI - プレプロトリプシンシグナルペプチド (MSALLILALVGAAVA (配列番号 18)) - FLAGタグ (DYKDDDDK (配列番号 19)) - Spe I - 6 x Hisタグ (HHHHH H (配列番号 20)) - Xba I - BamHI - EcoRV - Not I - Cla Iが伸長因子 (Elongation Factor) プロモーターの下流、ウシ成長ホルモンポリアダニル化配列の上流に位置する。

【0189】

pEF6/ssMyc:

pEF6/ssFLAGプラスミドのEcoRI - Spe I部位に、合成ヌクレオチドgaattcaccatgtctgca cttctgacatctagctcttgttgaggctgcagttgctgactacgaagaggacgaacaaaaactcatctcagaagaggatct gactagt (配列番号 21) およびその相補鎖合成ヌクレオチドを組み込んだ。これにより、Kpn I - Nhe I - EcoRI - プレプロトリプシンシグナルペプチド (MSALLILALVGAAVA (配列番号 18)) - Mycタグ (EQKLISEEDL (配列番号 22)) - Spe I - 6 x Hisタグ (HHHH HH (配列番号 20)) - Xba I - BamHI - EcoRV - Not I - Cla Iが伸長因子プロモーターの下流、ウシ成長ホルモンポリアダニル化配列の上流に位置する。

【0190】

pEF6/FLAG:

pEF6/V5-Aプラスミド (Invitrogen) のKpn I - Pme I部位に、合成ヌクレオチドtggtac cgagctcggatccactagtcagtggtggaattctgcagatatccagcacagtgggcgccgtctagagactacaaaga cgatgacgacaagagagggtctcatcaccatcaccattgagcggccgcaaaccc (配列番号 23) およびその相補鎖合成ヌクレオチドを組み込んだ。これにより、Kpn I - BamHI - Spe I - EcoRI - EcoRV - Xba I - FLAGタグ (DYKDDDDK (配列番号 19)) - 6 x Hisタグ (HHHHHH (配列番号 20)) - ストップコドン - Not I が伸長因子プロモーターの下流、ウシ成長ホルモンポリアダニル化配列の上流に位置する。

【0191】

pEF6/ssFLAG - hDANCE:

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるヒトDANCEの25番アミノ酸からストップコドンまでをプライマーtctagagcacagtgacgaattgctttg (配列番号 24) およびgcgccggctagaatgggtactgcgacacatatatccg (配列番号 25) を用いてPCR法にて増幅し、pCR4-Blunt Topo (Invitrogen) に製品記載の方法によりクローニングし、配列を確認したあとXba I - Not Iで切り出し、pEF6/ssFLAGのSpe I - Not I部位に組み込んだ。

【0192】

pEF6/ssMyc-hLTBP2:

ヒトLTBP2の36番アミノ酸からストップコドンまでをtctagacaaagggaccccgtagggagatacag ag (配列番号 26) およびgcgccgccttggtactccttggcagtgagtg (配列番号 27) を用いてPCR法にて増幅し、上記と同様にpEF6/ssMycのSpe I - Not I部位に組み込んだ。

【0193】

pEF6-hDANCE-FLAG:

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるヒトDANCEの1番アミノ酸から最後の448番アミノ酸までをプライマーgaattcttcttctgccttcgcatctcctcc (配列番号 28) とtctagag aatgggtactgcgacacatatatccg (配列番号 29) を用いてPCR法にて増幅し、上記と同様にクローニング、シークエンスの後、EcoRI - Xba Iで切り出してpEF6/FLAGのEcoRI - Xba I部位に組み込んだ (図1)。

【0194】

pEF6-hDANCE(R77A)-FLAG:

Quick Change in vitro mutagenesis Kit (Stratagene) を用いてヒトDANCEの77番アミノ酸であるアルギニンをアラニンに置換した。その他はpEF6-hDANCE-FLAGに同じである。

。

【0195】

pEF6-hDANCE ΔND-FLAG:

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒトDANCEの1番アミノ酸から26番アミノ酸まで、78番アミノ酸から448アミノ酸までをそれぞれPCR法で増幅し、Nhe I部位で結合した後、pEF6/FLAGのEcoRI - Xba I部位に組み込んだ(図1)。

【0196】

pEF6-hDANCE ΔN-FLAG:

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒトDANCEの1番アミノ酸から26アミノ酸まで、113番アミノ酸から448アミノ酸までをそれぞれPCR法で増幅し、Nhe I部位で結合した後、pEF6/FLAGのEcoRI - Xba I部位に組み込んだ(図1)。

【0197】

pEF6-hDANCE ΔM-FLAG:

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒトDANCEの1番アミノ酸から112番アミノ酸まで、315番アミノ酸から448アミノ酸までをそれぞれPCR法で増幅し、Nhe I部位で結合した後、pEF6/FLAGのEcoRI - Xba I部位に組み込んだ(図1)。

【0198】

pEF6-hDANCE ΔC-FLAG:

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒトDANCEの1番アミノ酸から315番アミノ酸までをPCR法で増幅し、pEF6/FLAGのEcoRI - Xba I部位に組み込んだ(図1)。

【0199】

ヒトリシルオキシダーゼ (GenBankアクセッション番号: AF039291.1) cDNAにコードされるポリペプチド(417個のアミノ酸)の22番アミノ酸から417アミノ酸までをPCR法で増幅し、pEF6/ssMycのXbaI/NotI部位に組み込んだ。

【0200】

1. 2. 細胞、トランスフェクション

発現実験には293T細胞を用いた。トランスフェクションは、LipofectAMINE Plus試薬を用い、製品記載の方法で行った。トランスフェクション後24時間で無血清培地に交換し、さらに48時間培養した上清または細胞ライセートをウエスタンブロッティング、*in vitro* バインディングアッセイに用いた。

マウス新生仔の皮膚線維芽細胞は、“Current Protocols in Cell Biology”に記載の方法で採取、培養した。

ウシ大動脈平滑筋は、Cambrexより購入した。

【0201】

1. 3. 組換えDANCE

293T細胞とpEF6-hDANCE-FLAGを用いてヒトDANCE安定発現細胞株を作成し、その培養上清からNi-NTAアガロース (Qiagen) を用いて組換えDANCEを精製した後、脱塩カラム (Amersham) を用いて脱塩した。

【0202】

1. 4. 抗体

抗マウスDANCE抗体BSYN1923は、マウスDANCE76 - 98アミノ酸に対応する合成ペプチドをウサギに免疫して作成し、抗原ペプチドを固定したカラムを用いてアフィニティー精製した。抗エラスチンモノクローナル抗体はChemiconとElastin Products Company (EPC) から、フィブリリン1ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体、フィブリリン2ポリクローナル抗体、LTBP2モノクローナル抗体はEPCから購入した。抗FLAG M2抗体と抗FLAG M2アガロースはSigma、抗Myc (9E10) 抗体はSanta Cruzより購入した。

【0203】

1. 5. 35S-Met, Cysを用いたメタボラベリング (metabolabelling)、免疫沈降、*in vitro* バインディングアッセイ、ウエスタンブロッティング

“Molecular Cloning, 3rd Ed.”に記載の方法で行った。

【0204】

実施例 1 : DANCEの一部はin vitro, in vivoにおいてN末端が切断されている

1. 1. ヒト及びマウスDANCEの293T細胞での強制発現

シグナルペプチド切断部位直下にFLAGタグをつけたヒト及びマウスDANCE cDNAを293T細胞にトランスフェクションし、無血清培地に交換後48時間培養を続け、その培養上清15 μ lをSDS-PAGEで展開し、ウエスタンブロットを行った。抗体はマウスDANCEの76-98番目のアミノ酸に対応するペプチドをウサギに免疫して得られたBSYN、および抗FLAG M2抗体を用いた。

その結果、図2に示す通り、BSYNはヒトDANCEを認識せず、マウスDANCEは2本のバンドとして検出された。これに対して抗FLAG M2抗体は、ヒト・マウスDANCEを1本のバンドとして検出した。

【0205】

1. 2. マウス由来皮膚線維芽細胞でのDANCEの発現

新生仔期のDANCEノックアウトマウス (Nature 415: 171-175 (2002) 参照) およびその同腹のコントロールマウス皮膚より線維芽細胞を培養し、³⁵S-Met, Cysで24時間ラベルした後、培養上清をBSYN抗体で免疫沈降した。免疫沈降物はSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィで検出した。

その結果、DANCE+/+マウス由来の皮膚線維芽細胞では2本のバンドが検出され、DANCE-/-マウス由来の皮膚線維芽細胞ではバンドが検出されなかった (図3)。

【0206】

1. 3. マウス肺組織のウエスタンブロット

12週齢のDANCEノックアウトマウスおよびその同腹のコントロールマウスの肺組織抽出物をSDS-PAGEにて展開し、BSYN抗体でウエスタンブロットを行った。

その結果、DANCE+/+マウスの肺組織では、DANCEが2本のバンドとして検出され、DANCE-/-マウスの肺組織ではバンドが検出されなかった (図4)。

【0207】

実施例 2 : 切断型DANCEのN末端は、DANCEの78番目以降のアミノ酸と一致する

カルボキシル末端にFLAGタグと6 x HisタグのついたヒトDANCE cDNAを293T細胞にトランスフェクションし、安定発現株を樹立した。その無血清培養上清800 mlよりNi-NTAアガロース (Qiagen) を用いて組換えDANCEを精製し、SDS-PAGEで展開してCoomassie-Blueで染色した。主要なバンド2本のうち、切断型DANCEに相当するバンドを切り出し、エドマン分解によりN末端アミノ酸配列を解析した (図5)。

その結果、切断型DANCEのN末端アミノ酸配列は、DANCEの78番目以降のアミノ酸配列と一致していた。

以上より、この低分子量タンパク質は、DANCEの77番目のアミノ酸と78番目のアミノ酸との間での切断により生じると考えられた。

【0208】

実施例 3 : DANCEの切断はセリンプロテアーゼインヒビターで阻害される

カルボキシル末端にFLAGタグと6 x HisタグのついたヒトDANCE cDNAを293T細胞にトランスフェクションし、システインプロテアーゼインヒビター (E64) またはセリンプロテアーゼインヒビター (アプロチニン) を含む無血清培地で48時間培養し、培養上清からNi-NTAアガロースを用いて沈降させた組換えタンパク質をSDS-PAGEで展開し、抗FLAG M2抗体でウエスタンブロットを行った。

その結果、DANCEの切断はE64で阻害されなかったが、アプロチニンにより阻害された (図6)。

以上より、DANCEはセリンプロテアーゼにより切断されることが示唆された。

【0209】

実施例 4 : DANCEのArg77をAlaに置換すると切断されにくくなる

DANCEの77番目のアルギニンをアラニンに置換した変異型DANCE (C末端FLAG, 6 x Hisタグつき) (図7) の発現ベクター、及び正常型DANCE (C末端FLAG, 6 x Hisタグつき) の発現ベクターを293T細胞にトランスフェクションし、無血清培地で48時間培養した培養

上清からNi-NTAアガロースを用いて沈降させた組換えタンパク質をSDS-PAGEで展開し、抗FLAG M2抗体でウェスタンブロットを行った。

その結果、この変異型DANCEは、プロテアーゼによる切断に対して抵抗性を示すことが明らかとなった(図8)。

【0210】

実施例5. DANCEはホモ複合体を形成し、また、LTBP2とも結合する

9cmプレートに播いたウシ大動脈平滑筋細胞を35S-Met, Cysで24時間ラベルした後、培養上清と組換えヒトDANCE(C末端FLAG, 6 x Hisつき) 50 µgを混ぜて、抗FLAGアガロース(Sigma)で沈降させたものをSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィを行った。同じ培養上清を、弾性線維構成タンパク質(エラスチン、フィブリリン1、フィブリリン2、LTBP2)に対する市販の抗体で免疫沈降し、同じSDS-PAGEゲルで展開し、オートラジオグラフィを行った。

その結果、DANCEがホモ複合体を形成すること、及びDANCEがLTBP2に結合することが明らかとなった(図9)。

【0211】

実施例6: ヒトDANCEとDANCE又はLTBP2との結合領域の解析

実施例5の結果より、DANCE同士の結合領域、DANCEのLTBP2に対する結合領域を解析することとした。

FLAGタグのついたヒトDANCEコンストラクト(図8)、MycタグのついたヒトDANCEコンストラクト、及びヒトLTBP2コンストラクトを別々に293T細胞にトランスフェクションした。無血清培地で48時間培養後、それぞれの培養上清と細胞抽出液を混ぜ、タンパク質溶液とした。FLAGタグのついたDANCEコンストラクトからのタンパク質溶液と、MycタグのついたDANCEまたはLTBP2からのタンパク質溶液を氷上で1時間混ぜ、抗FLAG抗体で沈降させたものをSDS-PAGEで展開し、抗Myc抗体または抗FLAG抗体で検出した。

その結果、DANCE同士の結合には、N末端ドメインが、DANCEとLTBP2との結合にはDANCEの中央のドメインが必要であることが明らかとなった(図10)。また、DANCEとLTBP2との結合は、DANCEのN末端又はC末端ドメインが欠損しているほうが強いことが明らかとなった。

【0212】

実施例7: DANCEはリシルオキシダーゼに結合し得る

リシルオキシダーゼの遺伝子欠損マウスの表現型(J. Biol. Chem. 278(16): 14387-93 (2003); Circulation 106(19): 2503-9 (2002))は、本発明者らが以前に報告しているDANCE遺伝子欠損マウスの表現型(Nature 415: 171-175 (2002))に非常に類似することを本発明者らは見出した。そこで、本発明者らはDANCEとリシルオキシダーゼとの複合体の形成がその機能の発揮に重要である可能性があると考え、DANCEがリシルオキシダーゼに結合するか否かを評価した。なお、アッセイは、抗FLAG抗体で沈降させたものをSDS-PAGEで展開し、抗Myc抗体で検出した以外は、実施例6と同様にして行った。

その結果、DANCEはリシルオキシダーゼに結合することが示唆された(図11)。

【0213】

考察

1. DANCEとLTBP2の結合

本発明者らは、DANCEがLTBP2と特異的に結合することを見出した。この結合は、DANCEの中央にあるカルシウム結合性EGF様モチーフが連続するドメインを介しておきる。これまでに、本発明者らはDANCEのアミノ末端ドメインが細胞表面インテグリンに結合することを報告し、LiuらはDANCEのカルボキシル末端側の半分でLOXL1に結合することを報告した。しかしエラスチンは細胞表面に密着して沈着するのではなく、ミクロフィブリルに沿って沈着していき、成熟した弾性線維になることが知られている(Matrix Biol. 19: 455-6 (2000))。したがって、DANCEとLOXL1の結合がエラスチンのミクロフィブリルへの沈着・クロスリンクを促進するのであれば、DANCEはミクロフィブリルと結合しているはずである。ミクロフィブリルは長い細胞外線維であり、フィブリリン1、フィブリリン2、LT

BP2などの細長いタンパク質分子から成り立っていると考えられている。フィブリリンは1, 2どちらのノックアウトマウスも弾性線維の形成異常を来さず、フィブリリンとDANCEの結合も否定的である。LTBP2は、LTBPファミリーに属していながらLatent TGF β と結合せず、弾性線維中に局在するタンパク質であるが、その生体内での役割は、LTBP2ノックアウトマウスが早期胎生致死であることから、よくわかっていない(Mol. Cell Biol. 20: 4879-87 (2000))。今回の本発明者らの発見は、LTBP2がDANCEをマイクロフィブリル上につなぎ止めることによってエラスチンクロスリンク酵素をマイクロフィブリルに局在させ、マイクロフィブリルに沿ってエラスチンが沈着・クロスリンクするのを助けていることを示唆する。

【0214】

2. DANCE同士の結合

DANCEが単量体ではたらくのか、2量体もしくは多量体になるかどうかは今までわかっていなかったが、今回、平滑筋培養上清中にある主要なDANCE結合タンパク質としてDANCEが見出された。このことはDANCEがホモ複合体(2量体または多量体)を形成することを示している。DANCE同士の結合はアミノ末端ドメインを介している。以前、本発明者らは、DANCEのアミノ末端ドメインが細胞表面インテグリンに結合することを示したが(J. Biol. Chem. 274(32): 22476-22483 (1999))、今回のデータはアミノ末端ドメインの新たな機能としてDANCE同士の結合促進があることを意味している。

【0215】

3. DANCEアミノ末端ドメインの切断

本発明者らは、in vivo、in vitroにおいてDANCEの一部はアミノ末端ドメインが切断されることを見出した。この切断は未同定のセリンプロテアーゼによっておこり、切断部位のアルギニンをアラニンに置換すると切断されにくくなる。DANCEアミノ末端ドメインの機能から推測されるように、切断型DANCEは、(1)細胞表面インテグリンと結合しなくなり、(2)DANCE同士で結合しなくなり、また、(3)切断型DANCEは全長DANCEよりもLTBP2との結合が強くなる。これら(1)～(3)の新知見は、生体内ではプロテアーゼによるDANCEの切断が、DANCEの機能変化、ひいては弾性線維形成の制御機構としてはたらいっていることを示唆する。この考えに基づけば、薬剤によるDANCE切断プロテアーゼの阻害もしくは促進が、弾性線維劣化の予防・再生促進に有用であり得る。

【0216】

4. DANCEとリシルオキシダーゼの結合

LOXL1遺伝子欠損マウスは弾性線維形成異常を来す。LOXL1はDANCEと直接会合し、DANCEによって弾性線維形成部位につなぎとめられてエラスチンのクロスリンクを行うと考えられる。しかし、LOXL1遺伝子欠損マウスの表現型はDANCE遺伝子欠損マウスの表現型と比べると弱く、LOXL1との結合だけではDANCEの作用の全てを説明できない。リシルオキシダーゼ遺伝子欠損マウスもやはり弾性線維形成異常を来すが、今回本発明者が見出したDANCEとリシルオキシダーゼの結合は、DANCEがリシルオキシダーゼを繋ぎとめることでエラスチンのクロスリンクが効率よく行われることを示唆する。

【0217】

実施例8: DANCEの切断を調節する物質のスクリーニング

カルボキシル末端にFLAGタグと6 x HisタグのついたヒトDANCE cDNAを293T細胞にトランスフェクションし、被検物質の存在下、不在下の無血清培地で48時間培養し、培養上清からNi-NTAアガロースを用いて沈降させたヒトDANCEをSDS-PAGEで展開し、抗FLAG M2抗体でウエスタンブロットを行う。被検物質の存在下、不在下において、それぞれ2本のバンドを定量解析することで、被検物質がDANCEの切断を調節し得るか否かを評価する。

【産業上の利用可能性】

【0218】

本発明のスクリーニング方法は、弾性線維形成を調節し得る新規作用機序の医薬の開発、又はDANCE特異的プロテアーゼの同定を可能にする。また、本発明の測定方法は、弾性線維形成の状態の診断を可能とする。さらに、本発明のポリペプチド、抗体、複合体

及びキットは、本発明の方法を行うため、弾性線維形成の調節が所望される状態の予防、治療又は改善のため、あるいは研究・診断用試薬などとして好適である。

【図面の簡単な説明】

【0219】

【図1】 DANCE欠失変異体のコンストラクトを示す図である。横線ボックス：シグナル配列；白ボックス：カルシウム結合性EGF様（c b E G F）モチーフ；黒ボックス：R G Dモチーフ；縦線ボックス：C末端ドメイン；斜線ボックス：F L A G タグ。

【図2】 293 T細胞でのヒト、マウスDANCEの強制発現を示す図である。

【図3】 マウス皮膚線維芽細胞の培養上清におけるDANCEの発現を示す図である。

【図4】 マウス肺組織のウェスタンブロッティングを示す図である。

【図5】 全長DANCE、N末端切断DANCEの精製を示す図である。

【図6】 セリンプロテアーゼインヒビターによるDANCEの切断阻害を示す図である。

【図7】 インビトロ培養物におけるヒトDANCEの切断部位、及び変異型DANCEのアミノ酸変異部位を示す図である。

【図8】 変異型DANCE（R77A）によるDANCE切断量の低下を示す図である。

【図9】 平滑筋細胞培養物におけるDANCE結合タンパク質を示す図である。

【図10】 DANCE欠失変異体を用いた、DANCE同士の結合、DANCEとLTBP2の結合に必要な領域の解析を示す図である。

【図11】 DANCEとリシルオキシダーゼの結合を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SHIRANKAI

<120> Cleaved forms of DANCE and DANCE complexes, and methods of screening an agent for regulating formation of elastic fibre using them

<130> A6261

<160> 29

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1)..(1347)

<400> 1

<400> 1
atg cca gga ata aaa agg ata ctc act gtt acc att ctg gct ctc tgt 48
Met Pro Gly Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys
1 5 10 15

ctt cca agc cct ggg aat gca cag gca cag tgc acg aat ggc ttt gac 96
Leu Pro Ser Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp
20 25 30

ctg gat cgc cag tca gga cag tgt tta gat att gat gaa tgc cga acc 144
Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr
35 40 45

atc ccc gag gcc tgc cga gga gac atg atg tgt gtt aac caa aat ggc 192
Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly
50 55 60

ggg tat tta tgc att ccc cgg aca aac cct gtg tat cga ggg ccc tac 240
Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr
65 70 75 80

tcg aac ccc tac tcg acc ccc tac tca ggt ccg tac cca gca gct gcc 288
Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala
85 90 95

cca cca ctc tca gct cca aac tat ccc acg atc tcc agg cct ctt ata 336

Pro	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Asn	Tyr	Pro	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Leu	Ile		
			100					105					110				
tgc	cgc	ttt	gga	tac	cag	atg	gat	gaa	agc	aac	caa	tgt	gtg	gat	gtg		384
Cys	Arg	Phe	Gly	Tyr	Gln	Met	Asp	Glu	Ser	Asn	Gln	Cys	Val	Asp	Val		
		115					120					125					
gac	gag	tgt	gca	aca	gat	tcc	cac	cag	tgc	aac	ccc	acc	cag	atc	tgc		432
Asp	Glu	Cys	Ala	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Cys	Asn	Pro	Thr	Gln	Ile	Cys		
		130					135				140						
atc	aat	act	gaa	ggc	ggg	tac	acc	tgc	tcc	tgc	acc	gac	gga	tat	tgg		480
Ile	Asn	Thr	Glu	Gly	Gly	Tyr	Thr	Cys	Ser	Cys	Thr	Asp	Gly	Tyr	Trp		
		145				150				155					160		
ctt	ctg	gaa	ggc	cag	tgc	tta	gac	att	gat	gaa	tgt	cgc	tat	ggt	tac		528
Leu	Leu	Glu	Gly	Gln	Cys	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Tyr	Gly	Tyr		
				165					170					175			
tgc	cag	cag	ctc	tgt	gcg	aat	gtt	cct	gga	tcc	tat	tct	tgt	aca	tgc		576
Cys	Gln	Gln	Leu	Cys	Ala	Asn	Val	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Thr	Cys		
			180					185						190			
aac	cct	ggt	ttt	acc	ctc	aat	gag	gat	gga	agg	tct	tgc	caa	gat	gtg		624
Asn	Pro	Gly	Phe	Thr	Leu	Asn	Glu	Asp	Gly	Arg	Ser	Cys	Gln	Asp	Val		
		195					200					205					
aac	gag	tgt	gcc	acc	gag	aac	ccc	tgc	gtg	caa	acc	tgc	gtc	aac	acc		672
Asn	Glu	Cys	Ala	Thr	Glu	Asn	Pro	Cys	Val	Gln	Thr	Cys	Val	Asn	Thr		
		210				215					220						
tac	ggc	tct	ttc	atc	tgc	cgc	tgt	gac	cca	gga	tat	gaa	ctt	gag	gaa		720
Tyr	Gly	Ser	Phe	Ile	Cys	Arg	Cys	Asp	Pro	Gly	Tyr	Glu	Leu	Glu	Glu		
					225		230			235				240			
gat	ggc	gtt	cat	tgc	agt	gat	atg	gac	gag	tgc	agc	ttc	tct	gag	ttc		768
Asp	Gly	Val	His	Cys	Ser	Asp	Met	Asp	Glu	Cys	Ser	Phe	Ser	Glu	Phe		
				245				250						255			
ctc	tgc	caa	cat	gag	tgt	gtg	aac	cag	ccc	ggc	aca	tac	ttc	tgc	tcc		816
Leu	Cys	Gln	His	Glu	Cys	Val	Asn	Gln	Pro	Gly	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ser		
			260					265					270				
tgc	cct	cca	ggc	tac	atc	ctg	ctg	gat	gac	aac	cga	agc	tgc	caa	gac		864
Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Ile	Leu	Leu	Asp	Asp	Asn	Arg	Ser	Cys	Gln	Asp		
		275					280					285					
atc	aac	gaa	tgt	gag	cac	agg	aac	cac	acg	tgc	aac	ctg	cag	cag	acg		912
Ile	Asn	Glu	Cys	Glu	His	Arg	Asn	His	Thr	Cys	Asn	Leu	Gln	Gln	Thr		
		290				295					300						

tgc tac aat tta caa ggg ggc ttc aaa tgc atc gac ccc atc cgc tgt 960
 Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys
 305 310 315 320

gag gag cct tat ctg agg atc agt gat aac cgc tgt atg tgt cct gct 1008
 Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala
 325 330 335

gag aac cct ggc tgc aga gac cag ccc ttt acc atc ttg tac cgg gac 1056
 Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp
 340 345 350

atg gac gtg gtg tca gga cgc tcc gtt ccc gct gac atc ttc caa atg 1104
 Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met
 355 360 365

caa gcc acg acc cgc tac cct ggg gcc tat tac att ttc cag atc aaa 1152
 Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys
 370 375 380

tct ggg aat gag ggc aga gaa ttt tac atg cgg caa acg ggc ccc atc 1200
 Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile
 385 390 395 400

agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg ccc cgg gaa atc 1248
 Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile
 405 410 415

cag ctg gac ttg gaa atg atc act gtc aac act gtc atc aac ttc aga 1296
 Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg
 420 425 430

ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tcg cag tac cca ttc 1344
 Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe
 435 440 445

tga 1347

<210> 2
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Gly Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys
 1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp
20 25 30

Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr
35 40 45

Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly
50 55 60

Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr
65 70 75 80

Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala
85 90 95

Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile
100 105 110

Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val
115 120 125

Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys
130 135 140

Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp
145 150 155 160

Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr
165 170 175

Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys
180 185 190

Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val
195 200 205

Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr

210

215

220

Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu
225 230 235 240

Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe
245 250 255

Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser
260 265 270

Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp
275 280 285

Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr
290 295 300

Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys
305 310 315 320

Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala
325 330 335

Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp
340 345 350

Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met
355 360 365

Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys
370 375 380

Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile
385 390 395 400

Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile
405 410 415

Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg
420 425 430

Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe
435 440 445

<210> 3
<211> 1278
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1278)

<400> 3
cag gca cag tgc acg aat ggc ttt gac ctg gat cgc cag tca gga cag 48
Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
1 5 10 15

tgt tta gat att gat gaa tgc cga acc atc ccc gag gcc tgc cga gga 96
Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
20 25 30

gac atg atg tgt gtt aac caa aat ggc ggg tat tta tgc att ccc cgg 144
Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
35 40 45

aca aac cct gtg tat cga ggg ccc tac tcg aac ccc tac tcg acc ccc 192
Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro
50 55 60

tac tca ggt ccg tac cca gca gct gcc cca cca ctc tca gct cca aac 240
Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn
65 70 75 80

tat ccc acg atc tcc agg cct ctt ata tgc cgc ttt gga tac cag atg 288
Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met
85 90 95

gat gaa agc aac caa tgt gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gat tcc 336
Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser
100 105 110

cac cag tgc aac ccc acc cag atc tgc atc aat act gaa ggc ggg tac 384
His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr

115	120	125	
acc tgc tcc tgc acc gac gga tat tgg ctt ctg gaa ggc cag tgc tta			432
Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu			
130	135	140	
gac att gat gaa tgt cgc tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gcg aat			480
Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn			
145	150	155	160
gtt cct gga tcc tat tct tgt aca tgc aac cct ggt ttt acc ctc aat			528
Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn			
	165	170	175
gag gat gga agg tct tgc caa gat gtg aac gag tgt gcc acc gag aac			576
Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn			
	180	185	190
ccc tgc gtg caa acc tgc gtc aac acc tac ggc tct ttc atc tgc cgc			624
Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg			
	195	200	205
tgt gac cca gga tat gaa ctt gag gaa gat ggc gtt cat tgc agt gat			672
Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp			
210	215	220	
atg gac gag tgc agc ttc tct gag ttc ctc tgc caa cat gag tgt gtg			720
Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val			
225	230	235	240
aac cag ccc ggc aca tac ttc tgc tcc tgc cct cca ggc tac atc ctg			768
Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu			
	245	250	255
ctg gat gac aac cga agc tgc caa gac atc aac gaa tgt gag cac agg			816
Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg			
	260	265	270
aac cac acg tgc aac ctg cag cag acg tgc tac aat tta caa ggg ggc			864
Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly			
	275	280	285
ttc aaa tgc atc gac ccc atc cgc tgt gag gag cct tat ctg agg atc			912
Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile			
290	295	300	
agt gat aac cgc tgt atg tgt cct gct gag aac cct ggc tgc aga gac			960
Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp			
305	310	315	320

cag ccc ttt acc atc ttg tac cgg gac atg gac gtg gtg tca gga cgc 1008
 Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg
 325 330 335
 tcc gtt ccc gct gac atc ttc caa atg caa gcc acg acc cgc tac cct 1056
 Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro
 340 345 350
 ggg gcc tat tac att ttc cag atc aaa tct ggg aat gag ggc aga gaa 1104
 Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu
 355 360 365
 ttt tac atg cgg caa acg ggc ccc atc agt gcc acc ctg gtg atg aca 1152
 Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr
 370 375 380
 cgc ccc atc aaa ggg ccc cgg gaa atc cag ctg gac ttg gaa atg atc 1200
 Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile
 385 390 395 400
 act gtc aac act gtc atc aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg 1248
 Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu
 405 410 415
 cgg ata tat gtg tcg cag tac cca ttc tga 1278
 Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe
 420 425

<210> 4
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
 1 5 10 15

Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
 20 25 30

Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
 35 40 45

Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro
 50 55 60

Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn
65 70 75 80

Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met
85 90 95

Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser
100 105 110

His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr
115 120 125

Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu
130 135 140

Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn
145 150 155 160

Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn
165 170 175

Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn
180 185 190

Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg
195 200 205

Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp
210 215 220

Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val
225 230 235 240

Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu
245 250 255

Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg
260 265 270

Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly
275 280 285

Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile
290 295 300

Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp
305 310 315 320

Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg
325 330 335

Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro
340 345 350

Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu
355 360 365

Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr
370 375 380

Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile
385 390 395 400

Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu
405 410 415

Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe
420 425

<210> 5
<211> 162
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(162)

<400> 5

cag	gca	cag	tgc	acg	aat	ggc	ttt	gac	ctg	gat	cgc	cag	tca	gga	cag	48
Gln	Ala	Gln	Cys	Thr	Asn	Gly	Phe	Asp	Leu	Asp	Arg	Gln	Ser	Gly	Gln	
1				5					10					15		

tgt	tta	gat	att	gat	gaa	tgc	cga	acc	atc	ccc	gag	gcc	tgc	cga	gga	96
Cys	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Thr	Ile	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Gly	
			20					25					30			

gac	atg	atg	tgt	gtt	aac	caa	aat	ggc	ggg	tat	tta	tgc	att	ccc	cgg	144
Asp	Met	Met	Cys	Val	Asn	Gln	Asn	Gly	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ile	Pro	Arg	
			35					40						45		

aca	aac	cct	gtg	tat	cga											162
Thr	Asn	Pro	Val	Tyr	Arg											
			50													

<210> 6

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln	Ala	Gln	Cys	Thr	Asn	Gly	Phe	Asp	Leu	Asp	Arg	Gln	Ser	Gly	Gln
1				5					10					15	

Cys	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Thr	Ile	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Gly
			20					25					30		

Asp	Met	Met	Cys	Val	Asn	Gln	Asn	Gly	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ile	Pro	Arg
			35					40				45			

Thr	Asn	Pro	Val	Tyr	Arg
			50		

<210> 7

<211> 1116

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1116)

<400> 7

```

ggg ccc tac tgc aac ccc tac tgc acc ccc tac tca ggt ccg tac cca      48
Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
1              5              10              15

```

```

gca gct gcc cca cca ctc tca gct cca aac tat ccc acg atc tcc agg      96
Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
                20              25              30

```

```

cct ctt ata tgc cgc ttt gga tac cag atg gat gaa agc aac caa tgt      144
Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys
          35              40              45

```

```

gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gat tcc cac cag tgc aac ccc acc      192
Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
          50              55              60

```

```

cag atc tgc atc aat act gaa ggc ggg tac acc tgc tcc tgc acc gac      240
Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
65              70              75              80

```

```

gga tat tgg ctt ctg gaa ggc cag tgc tta gac att gat gaa tgt cgc      288
Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
          85              90              95

```

```

tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gcg aat gtt cct gga tcc tat tct      336
Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
          100              105              110

```

```

tgt aca tgc aac cct ggt ttt acc ctc aat gag gat gga agg tct tgc      384
Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys
          115              120              125

```

```

caa gat gtg aac gag tgt gcc acc gag aac ccc tgc gtg caa acc tgc      432
Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
          130              135              140

```

```

gtc aac acc tac ggc tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa      480
Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
          145              150              155              160

```

```

ctt gag gaa gat ggc gtt cat tgc agt gat atg gac gag tgc agc ttc      528
Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
          165              170              175

```

tct gag ttc ctc tgc caa cat gag tgt gtg aac cag ccc ggc aca tac 576
 Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr
 180 185 190

ttc tgc tcc tgc cct cca ggc tac atc ctg ctg gat gac aac cga agc 624
 Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser
 195 200 205

tgc caa gac atc aac gaa tgt gag cac agg aac cac acg tgc aac ctg 672
 Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu
 210 215 220

cag cag acg tgc tac aat tta caa ggg ggc ttc aaa tgc atc gac ccc 720
 Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro
 225 230 235 240

atc cgc tgt gag gag cct tat ctg agg atc agt gat aac cgc tgt atg 768
 Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met
 245 250 255

tgt cct gct gag aac cct ggc tgc aga gac cag ccc ttt acc atc ttg 816
 Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu
 260 265 270

tac cgg gac atg gac gtg gtg tca gga cgc tcc gtt ccc gct gac atc 864
 Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile
 275 280 285

ttc caa atg caa gcc acg acc cgc tac cct ggg gcc tat tac att ttc 912
 Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe
 290 295 300

cag atc aaa tct ggg aat gag ggc aga gaa ttt tac atg cgg caa acg 960
 Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
 305 310 315 320

ggc ccc atc agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg ccc 1008
 Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
 325 330 335

cgg gaa atc cag ctg gac ttg gaa atg atc act gtc aac act gtc atc 1056
 Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile
 340 345 350

aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tcg cag 1104
 Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
 355 360 365

tac cca ttc tga 1116
 Tyr Pro Phe

370

<210> 8
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
 20 25 30

Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys
 35 40 45

Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
 50 55 60

Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
 65 70 75 80

Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
 85 90 95

Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
 100 105 110

Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys
 115 120 125

Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
 130 135 140

Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
165 170 175

Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr
180 185 190

Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser
195 200 205

Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu
210 215 220

Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro
225 230 235 240

Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met
245 250 255

Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu
260 265 270

Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile
275 280 285

Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe
290 295 300

Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
305 310 315 320

Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
325 330 335

Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile
340 345 350

Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
355 360 365

Tyr Pro Phe
370

<210> 9
<211> 162
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(162)

<400> 9
cag cag cag tgc aca aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag tca gga cag 48
Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
1 5 10 15
tgt cta gat att gat gaa tgc cgg acc atc cct gag gct tgt cgt ggg 96
Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
20 25 30
gac atg atg tgt gtc aac cag aat ggc ggg tat ttg tgc atc cct cga 144
Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
35 40 45
acc aac cca gtg tat cga 162
Thr Asn Pro Val Tyr Arg
50

<210> 10
<211> 54
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln
1 5 10 15
Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
20 25 30
Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg

35

40

45

Thr Asn Pro Val Tyr Arg
50

<210> 11
<211> 1113
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1113)

<400> 11
ggg cct tac tca aat ccc tac tct aca tcc tac tca ggc cca tac cca 48
Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
1 5 10 15

gca gcg gcc cca cca gta cca gct tcc aac tac ccc acg att tca agg 96
Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
20 25 30

cct ctt gtc tgc cgc ttt ggg tat cag atg gat gaa ggc aac cag tgt 144
Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys
35 40 45

gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gac tca cac cag tgc aac cct acc 192
Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
50 55 60

cag atc tgt atc aac act gaa gga ggt tac acc tgc tcc tgc acc gat 240
Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
65 70 75 80

ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag tgc cta gat att gat gaa tgt cgc 288
Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
85 90 95

tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gca aat gtt cca gga tcc tat tcc 336
Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
100 105 110

tgt aca tgc aac cct ggt ttc acc ctc aac gac gat gga agg tct tgc 384
Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys
115 120 125

caa gat gtg aac gag tgc gaa act gag aat ccc tgt gtt cag acc tgt 432
 Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
 130 135 140

gtc aac acc tat ggc tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa 480
 Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

ctt gag gaa gat ggc att cac tgc agt gat atg gac gag tgc agc ttc 528
 Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
 165 170 175

tcc gag ttc ctc tgt caa cac gag tgt gtg aac cag ccg ggc tca tac 576
 Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr
 180 185 190

ttc tgc tcg tgc cct cca ggc tac gtc ctg ttg gat gat aac cga agc 624
 Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser
 195 200 205

tgc cag gat atc aat gaa tgt gag cac cga aac cac acg tgt acc tca 672
 Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser
 210 215 220

ctg cag act tgc tac aat cta caa ggg ggc ttc aaa tgt att gat ccc 720
 Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro
 225 230 235 240

atc agc tgt gag gag cct tat ctg ctg att ggt gaa aac cgc tgt atg 768
 Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met
 245 250 255

tgt cct gct gag cac acc agc tgc aga gac cag cca ttc acc atc ctg 816
 Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu
 260 265 270

tat cgg gac atg gat gtg gtg tca gga cgc tcc gtt cct gct gac atc 864
 Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile
 275 280 285

ttc cag atg caa gca aca acc cga tac cct ggt gcc tat tac att ttc 912
 Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe
 290 295 300

cag atc aaa tct ggc aac gag ggt cga gag ttc tat atg cgg caa aca 960
 Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
 305 310 315 320

ggg cct atc agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg cct 1008
 Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro

<210>	12
<211>	371
<212>	PRT
<213>	Mus musculus

<400> 12

Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
20 25 30

Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys
35 40 45

Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
50 55 60

Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
65 70 75 80

Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
85 90 95

Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
100 105 110

Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys
115 120 125

Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
130 135 140

Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
165 170 175

Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr
180 185 190

Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser
195 200 205

Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser
210 215 220

Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro
225 230 235 240

Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met
245 250 255

Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu
260 265 270

Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile
275 280 285

Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe
290 295 300

Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
305 310 315 320

Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
325 330 335

Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile
340 345 350

Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
355 360 365

Tyr Pro Phe
370

<210> 13
<211> 162
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(162)

<400> 13
cag caa cag tgc acc aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag aca gga cag 48
Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Thr Gly Gln
1 5 10 15

tgt tta gat att gat gaa tgt cgg acc atc cct gag gct tgc cgt ggg 96
Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
20 25 30

gac atg atg tgt gtc aac cag aat ggc ggg tat ctg tgc atc cct cga 144
Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
35 40 45

acc aac cca gtg tat cga 162
Thr Asn Pro Val Tyr Arg
50

<210> 14
<211> 54
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Thr Gly Gln
 1 5 10 15

Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly
 20 25 30

Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg
 35 40 45

Thr Asn Pro Val Tyr Arg
 50

<210> 15
 <211> 1116
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1116)

<400> 15
 ggg ccc tac tcc aat ccc tac tct aca tcc tac tca ggc cca tac cca 48
 Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro
 1 5 10 15

gca gcc gca cca cca gtg cca gct tcc aac tac ccc acg att tcc agg 96
 Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg
 20 25 30

cct ctt gtc tgt cgc ttt ggg tat cag atg gat gaa ggc aac cag tgt 144
 Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys
 35 40 45

gtg gat gtg gac gag tgt gcg aca gat tca cac cag tgc aac cct acc 192
 Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr
 50 55 60

cag atc tgt atc aac acg gaa gga ggg tac acc tgc tcc tgc act gat 240
 Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
 65 70 75 80

ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag tgc cta gat att gat gaa tgt cgc 288
 Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
 85 90 95

tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gcg aat gtt cct gga tcc tat tcc 336
 Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
 100 105 110

tgt acg tgt aac cct ggc ttc acc ctc aac gat gat gga agg tct tgc 384
 Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys
 115 120 125

caa gat gtg aac gag tgt gaa act gag aac ccc tgt gtt cag acc tgc 432
 Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
 130 135 140

gtc aac acc tat ggt tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa 480
 Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

ctg gag gaa gat ggc att cac tgc agt gat atg gat gag tgc agc ttc 528
 Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
 165 170 175

tcc gag ttc ctc tgt caa cat gag tgt gtg aac cag ccg ggc tca tac 576
 Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr
 180 185 190

ttc tgc tca tgc cct cca ggc tac gtc ttg ttg gaa gat aac cga agc 624
 Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Glu Asp Asn Arg Ser
 195 200 205

tgc cag gat atc aat gaa tgt gag cac cgg aac cac aca tgc act ccc 672
 Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Pro
 210 215 220

ctg cag act tgc tac aat ctg caa ggg ggc ttc aaa tgt atc gac ccc 720
 Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro
 225 230 235 240

atc gtc tgc gag gag cct tat ctg ctg att ggg gat aac cgc tgt atg 768
 Ile Val Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Asp Asn Arg Cys Met
 245 250 255

tgc cct gct gag aat act ggc tgc agg gac cag cca ttc acc atc ttg 816
 Cys Pro Ala Glu Asn Thr Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu
 260 265 270

ttt cgg gac atg gat gtg gta tca gga cgc tct gtt cct gct gac atc 864
 Phe Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile

275	280	285	
ttc cag atg caa gca acg acc cga tac cct ggc gcc tat tac att ttc			912
Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe			
290	295	300	
cag atc aaa tct ggg aac gag ggt cga gag ttc tac atg cgg caa aca			960
Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr			
305	310	315	320
ggg cct atc agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg cct			1008
Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro			
325	330	335	
cgg gac atc cag ctg gac ttg gag atg atc acc gtc aac act gtc atc			1056
Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile			
340	345	350	
aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tac gtg tcc cag			1104
Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln			
355	360	365	
tat ccg ttc tga			1116
Tyr Pro Phe			
370			

<210> 16
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 16

Gly	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Tyr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ser	Gly	Pro	Tyr	Pro
1				5				10					15		

Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Ala	Ser	Asn	Tyr	Pro	Thr	Ile	Ser	Arg
			20				25						30		

Pro	Leu	Val	Cys	Arg	Phe	Gly	Tyr	Gln	Met	Asp	Glu	Gly	Asn	Gln	Cys
		35					40					45			

Val	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Ala	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Cys	Asn	Pro	Thr
	50					55					60				

Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp
65 70 75 80

Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg
85 90 95

Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser
100 105 110

Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys
115 120 125

Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys
130 135 140

Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe
165 170 175

Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr
180 185 190

Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Glu Asp Asn Arg Ser
195 200 205

Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Pro
210 215 220

Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro
225 230 235 240

Ile Val Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Asp Asn Arg Cys Met
245 250 255

Cys Pro Ala Glu Asn Thr Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu
260 265 270

Phe Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile
 275 280 285

Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe
 290 295 300

Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr
 305 310 315 320

Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro
 325 330 335

Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile
 340 345 350

Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln
 355 360 365

Tyr Pro Phe
 370

<210> 17
 <211> 173
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA encoding preprotrypsin signal peptide, FLAG tag, 6 x His tag and restriction sites

<400> 17
 ggtaccgcta gcgaattcac catgtctgca cttctgatcc tagctcttgt tggagctgca 60
 gttgctgact acaaagacga tgacgacaag actagtcatc atcaccatca ccattctaga 120
 gaaggatccg atatccgcgg ccgcatcgat tgactagctg aggccgcaaa ccc 173

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> preprotrypsin signal peptide

<400> 18

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala
1 5 10 15

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FLAG tag

<400> 19

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 6 x His tag

<400> 20

His His His His His His
1 5

<210> 21

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA encoding preprotrypsin signal peptide, Myc tag and restriction sites

<400> 21
gaattcacca tgtctgcact tctgataccta gctcttggtg gagctgcagt tgctgactac 60

gaagaggacg aacaaaaact catctcagaa gaggatctga ctagt

105

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Myc tag

<400> 22

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1

5

10

<210> 23

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA encoding FLAG tag, 6 x His tag and restriction sites

<400> 23

tggtaccgag ctcgatcca ctagtccagt gtggtggaat tctgcagata tccagcacag 60

tggcggccgt ctagagacta caaagacgat gacgacaaga gagggcttca tcatcaccat 120

caccattgag cggccgcaaa ccc 143

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying human DANCE

<400> 24

tctagagcac agtgcacgaa tggctttg 28

<210> 25

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying human DANCE

<400> 25
gcggccggtc agaatgggta ctgcgacaca tatatccg 38

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying human LTBP2

<400> 26
tctagacaaa gggaccccgt agggagatac gag 33

<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying human LTBP2

<400> 27
gcggccgcct ggtactcctt ggcagtgcag tggg 34

<210> 28
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying human DANCE

<400> 28
gaattcttct tctcgcttc gcatctcctc c 31

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer for amplifying human DANCE

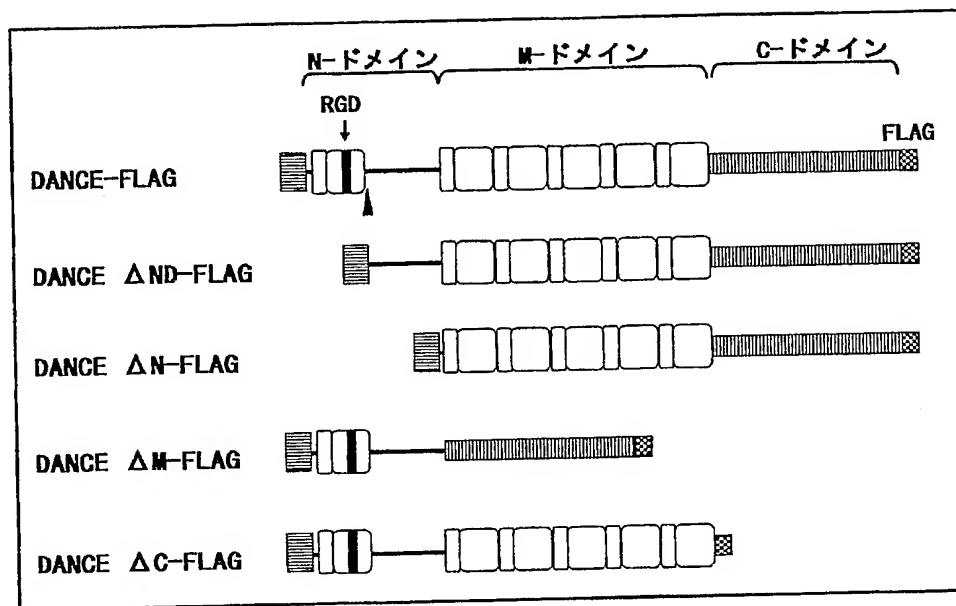
<400> 29

tctagagaat ggg tactgcg acacatatat ccg

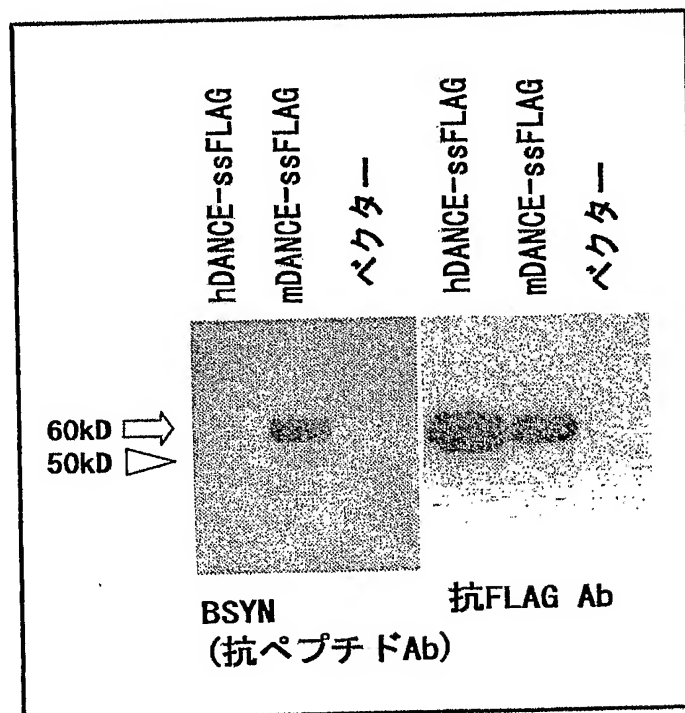
33

【書類名】 図面

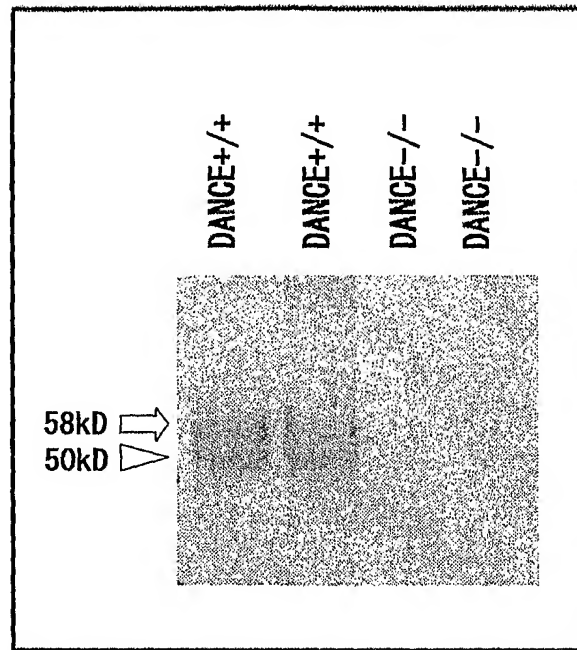
【図 1】



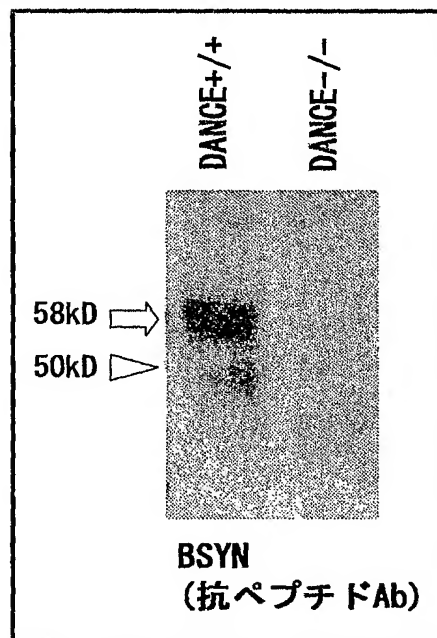
【図 2】



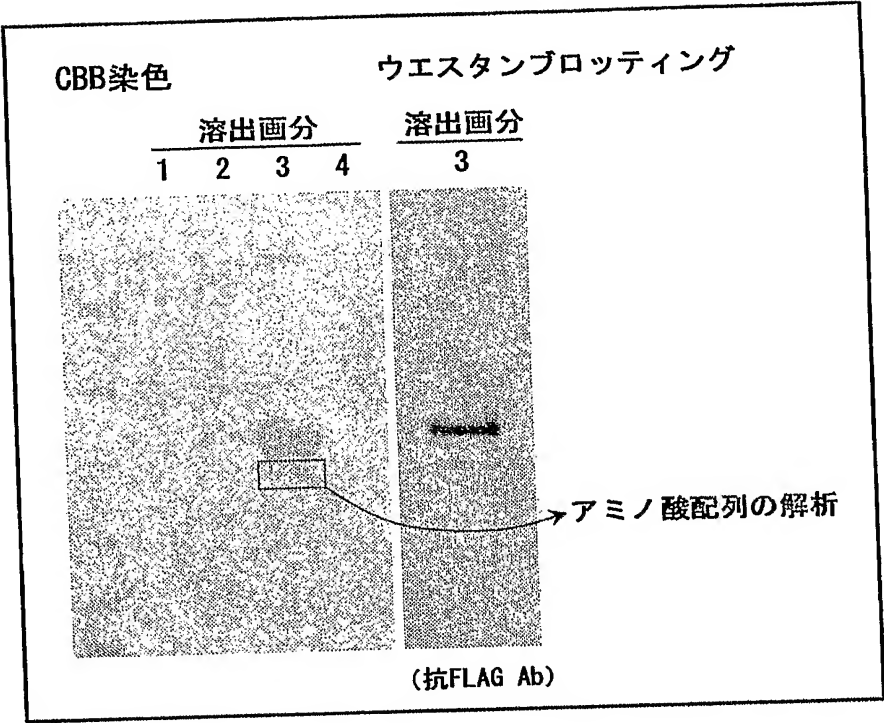
【図 3】



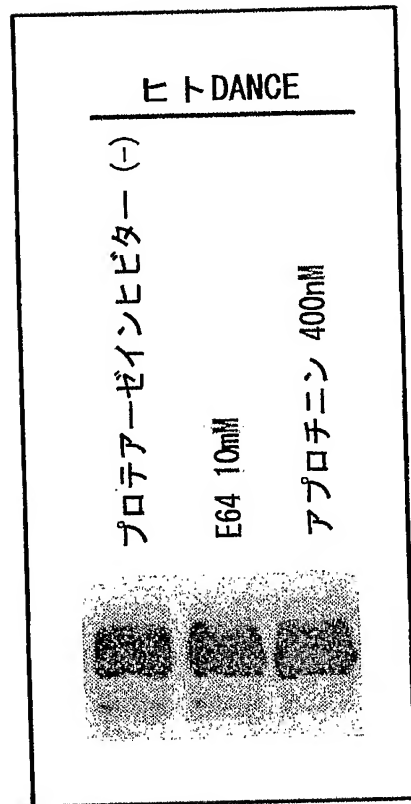
【図 4】



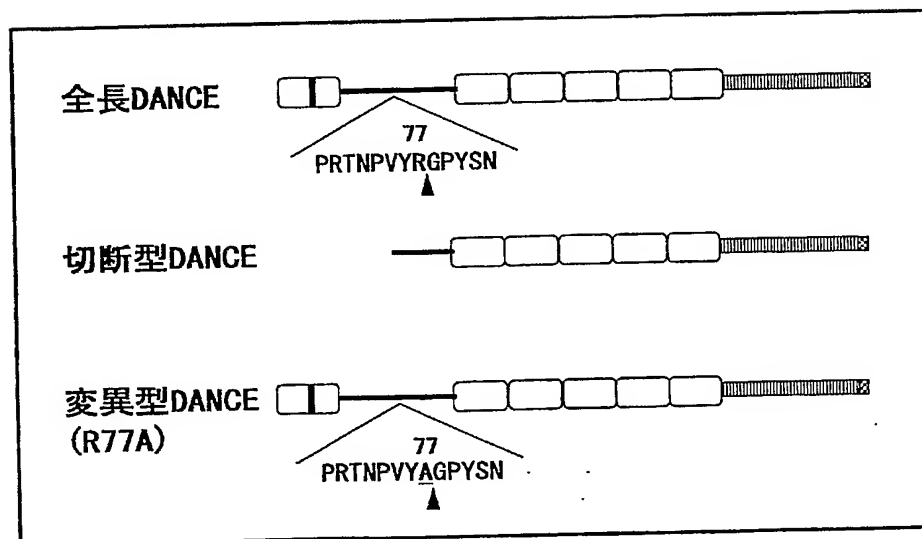
【図 5】



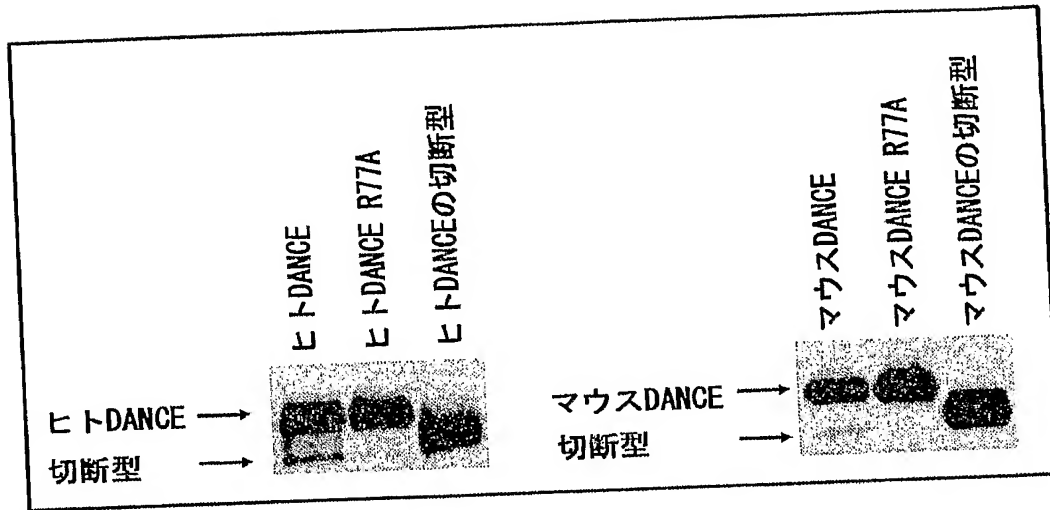
【図 6】



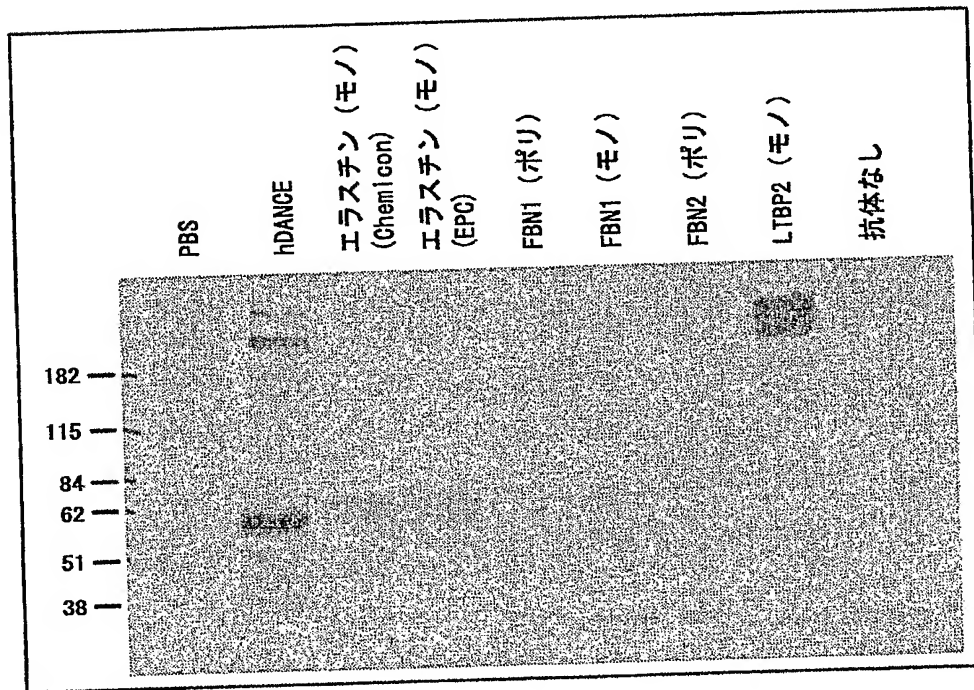
【図 7】



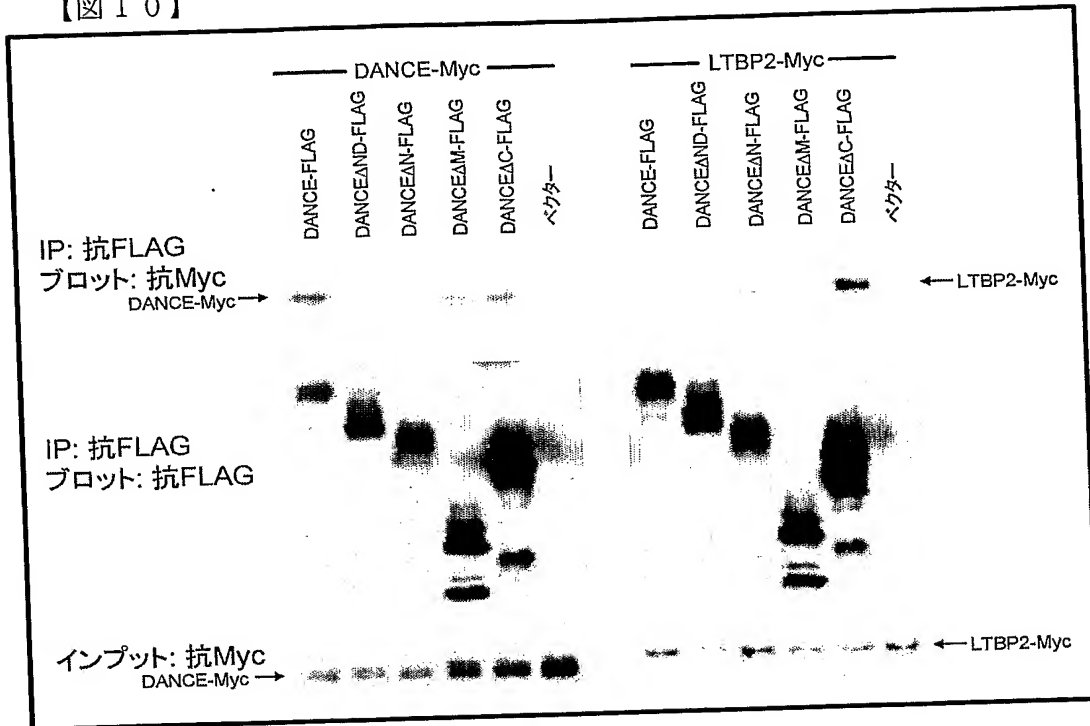
【図 8】



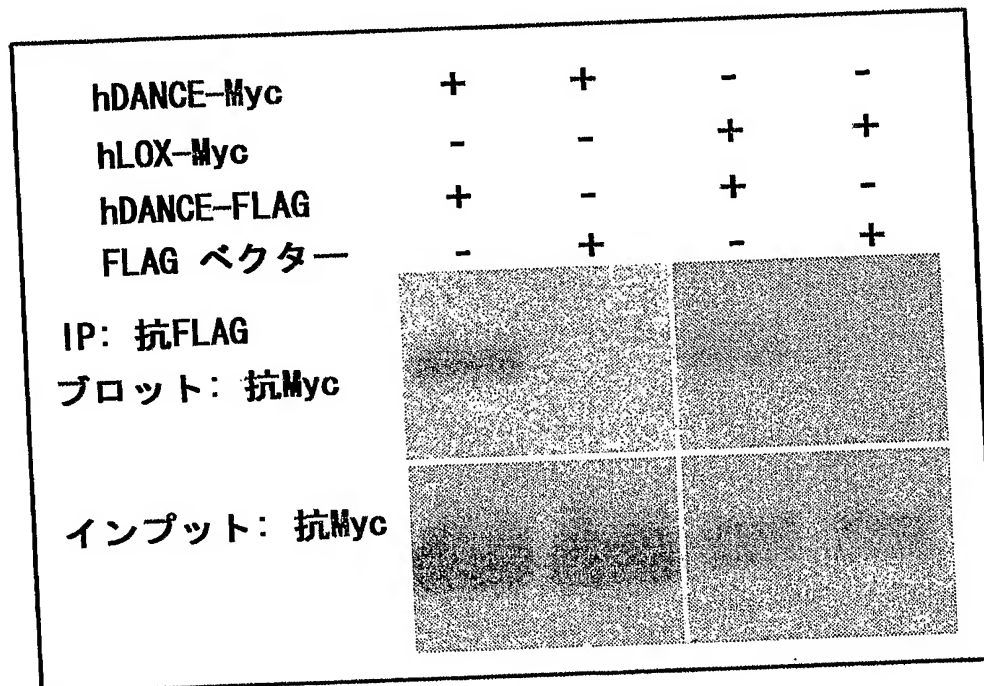
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】弾性線維形成を調節し得る新たな作用機序を有する医薬の開発を可能にするスクリーニング方法、当該方法に必要な種々の手段を提供すること

【解決手段】DANCEの切断により得られるポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド；DANCEの切断方法；DANCEの切断により得られるポリペプチドに対する抗体；DANCE切断量の測定方法・キット；DANCE変異体及びそれをコードするポリヌクレオチド；種々のDANCE複合体及びその調製方法；DANCEの活性を調節し得る物質又はDANCE特異的プロテアーゼのスクリーニング方法、及びそれにより得られる物質；弾性線維形成調節剤；並びにDANCE及びそれをコードするポリヌクレオチドを少なくとも含むキットなど。

【選択図】なし

【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 A6261
【提出日】 平成16年12月 9日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2004- 96685
【承継人】
 【識別番号】 504132272
 【氏名又は名称】 国立大学法人京都大学
【承継人代理人】
 【識別番号】 100080791
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高島 一
 【電話番号】 06-6227-1156
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 006965
 【納付金額】 4,200円
【提出物件の目録】
 【物件名】 承継人であることを証明する書面 1
 【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。
 【物件名】 委任状 1
 【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-096685
受付番号	50402108149
書類名	出願人名義変更届
担当官	林 圭輔 9868
作成日	平成 17 年 1 月 25 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】

504132272

【住所又は居所】

京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1

【氏名又は名称】

国立大学法人京都大学

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】

100080791

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治

安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所

【氏名又は名称】

高島 一

特願 2 0 0 4 - 0 9 6 6 8 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 1 0 7 6 3]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 8 月 2 7 日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府京都市左京区吉田牛の宮町 1 1 - 1
氏 名	社団法人芝蘭会

特願 2 0 0 4 - 0 9 6 6 8 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 4 1 3 2 2 7 2]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 4 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1

氏 名

国立大学法人京都大学